THESE de DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie
- Paris 6 -

par Monsieur Gérard PEAUCELLIER

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse :

ETUDE DE LA REINITIATION DE LA MEIOSE DES OVOCYTES CHEZ L'ANNELIDE POLYCHETE *Sabellaria alveolata (L.)*

soutenue le 14 Décembre 1982

devant le jury composé de :

M J. BERGERARD

M R. OZON

M J. PUDLES

M P. CASSIER

M A. COLLENOT

M J. DEMAILLE

LIBRARY
LELAND
STANFORD
JUNIOR
UNIVERSITY

THESE de DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie
- Paris 6 -

par Monsieur *Gérard PEAUCELLIER*

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse :

ETUDE DE LA REINITIATION DE LA MEIOSE DES OVOCYTES CHEZ L'ANNELIDE POLYCHETE *Sabellaria alveolata (L.)*

soutenue le *14 Décembre 1982*

devant le jury composé de :

M *J. BERGERARD*

M *R. OZON*

M *J. PUDLES*

M *P. CASSIER*

M *A. COLLENOT*

M *J. DEMAILLE*

AVANT PROPOS

Le présent travail a été réalisé à la Station Biologique de Roscoff (Université Pierre et Marie Curie et Centre d'Etudes d'Océanographie et de Biologie marine du C.N.R.S.), sous la direction de Monsieur le Professeur BERGERARD.

C'est à Monsieur le Professeur BERGERARD que je dois ma carrière d'enseignant et mon orientation vers l'embryologie expérimentale. Je tiens à l'assurer de ma profonde gratitude et à le remercier de m'avoir toujours procuré les moyens d'effectuer une telle recherche et de m'avoir prodigué conseils et encouragements au cours de la réalisation de ce travail, puis lors de la rédaction de ce mémoire.

Monsieur J. PUDLES, Maître de Recherches au C.N.R.S., a toujours manifesté un intérêt bienveillant au développement de mes travaux. Ses conseils m'ont été particulièrement précieux pour la réalisation de la partie enzymologique de ces recherches. Je l'en remercie vivement, ainsi que d'avoir accepté de juger de ce travail en tant que rapporteur.

J'adresse également ma sincère gratitude à Messieurs les Professeurs R. OZON, P. CASSIER, A. COLLENOT et J.G. DEMAILLE pour avoir bien voulu examiner mon travail et faire partie de ce jury.

Je dois une grande reconnaissance à Monsieur le Professeur M. DOREE qui s'est toujours intéressé à mes problèmes et m'a apporté sa précieuse collaboration.

Je veux associer dans mes remerciements tous les membres du laboratoire qui, par leur contribution, dévouement, amitié et sympathie, ont permis la réalisation de ce travail dans une ambiance agréable. Je suis particulièrement redevable à Monsieur A. PICARD dont l'aide et les conseils m'ont été d'une grande utilité.

Les observations en microscopie électronique ont été faites au cours de trop brefs séjours dans le laboratoire de microscopie électronique appliquée à la Biologie de Monsieur le Professeur COUTEAUX et, dernièrement, de Génétique

des virus de Monsieur le Professeur BRUN, au centre de recherches du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de mes remerciements.

La partie technique de ce travail a été effectuée avec le précieux concours de Madame A. CUEFF. Je lui suis particulièrement reconnaissant de l'efficacité et du dévouement dont elle a fait preuve dans l'accomplissement de tâches parfois fastidieuses. Je n'oublie pas l'aide que m'a apportée Madame C. GUERRIER et, à toutes, je tiens à exprimer mon amicale gratitude.

Qu'il me soit également permis de remercier Madame J. BOURDON, pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation des planches photographiques, ainsi que Monsieur J.L. DOUVILLE et Madame C. LEROUX, pour les programmes de tracé de courbes, grâce auxquels ont été réalisées de nombreuses figures de ce mémoire.

Un grand merci enfin à Madame S. LE GUEN et Madame N. GUYARD pour le soin qu'elles ont apporté à la présentation de ce texte ainsi qu'à Monsieur J.C. LORGERE et Monsieur F. THOMAS pour la rapidité avec laquelle ils en ont assuré le tirage en offset.

Il ne m'est malheureusement pas possible de remercier tous ceux qui m'ont aidé, d'une façon ou d'une autre, lors de ce travail. Qu'ils veuillent bien m'en excuser et trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

1ère PARTIE : DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA MEIOSE 5

Matériel et méthodes 6

1 - Réaction corticale 10

2 - Transition prophase I - métaphase I 15

3 - Fécondation et achèvement de la méiose 27

2ème PARTIE : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEASES DECLENCHANT LA MATURATION 33

Matériel et méthodes 34

1 - Fractionnement par filtration sur gel 40

2 - Fractionnement par chromatographie d'affinité et échangeuse d'ions 45

3 - Propriétés physicochimiques et enzymatiques des protéases purifiées 53

Conclusion 68

3ème PARTIE : FACTEURS DECLENCHANT LA LEVEE DU BLOCAGE PROPHASIQUE 71

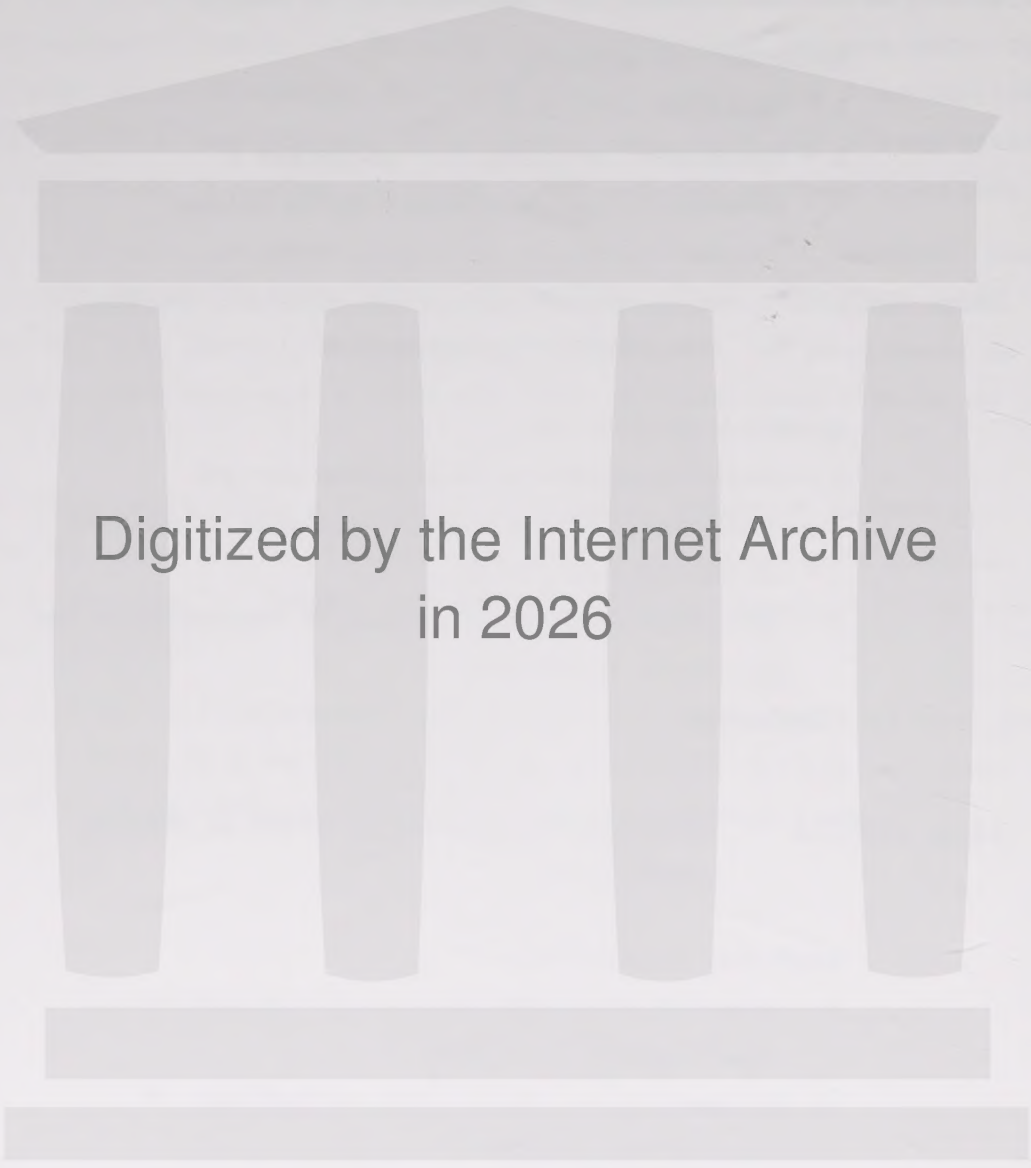
Matériel et méthodes 71

1 - Relation entre activité protéolytique et déblocage de la méiose 74

2- Relation entre spécificité enzymatique et activité biologique 83

3 - Relation. entre maturation et fécondation 90

Conclusion 95


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547326_0027

4ème PARTIE : ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE LA REINITIATION DE LA MEIOSE 98

1 - Rôle du Calcium 98
2 - Rôle des variations de perméabilité membranaires 110
3 - Libération d'acide 117
4 - Phosphorylation des protéines 127
5 - Autres changement métaboliques lors de la méiose 149

CONCLUSION GENERALE 159

ANNEXE 1 : "Mise en évidence d'un comportement anormal de diverses enzymes protéolytiques en filtration sur gel de polyacrylamide-agarose" 162

ANNEXE 2 : "Acid release at activation and fertilization of starfish oocyte" 166

RESUME 176

BIBLIOGRAPHIE 181

fin des années soixante que ce sujet connut un regain d'intérêt avec la découverte du déclenchement de la maturation par la progestérone chez les Amphibiens (MASUI, 1967; SCHUETZ, 1967) ou l'Esturgeon (DETTLAFF *et al.* 1969) et par la 1-méthyladénine chez l'Etoile de mer (KANATANI *et al.* 1969).

Actuellement les recherches sur ce sujet sont actives car l'intérêt général qu'il présente est bien perçu. C'est en effet un excellent modèle de régulation au niveau cellulaire, et de plus, sur des cellules isolées, ce qui facilite l'étude *in vitro*.

Les substances déclenchantes sont dans la plupart des cas de type hormonal, c'est donc un moyen d'étude favorable d'une interaction hormone-cellule cible. Les résultats déjà acquis sur la maturation ont d'ailleurs confirmé son intérêt pour la compréhension des processus généraux de régulation cellulaire. Ainsi, chez l'Etoile de mer, les Batraciens et l'Esturgeon, la stimulation hormonale fait apparaître dans le cytoplasme de l'ovocyte un facteur autocatalytique amplifiable (MPF : maturation promoting factor) qui provoque la réinitiation de la méiose lorsqu'il est injecté dans un ovocyte bloqué (MASUI *et al.* 1971; KISHIMOTO *et al.* 1976, DETTLAFF *et al.* 1977). Ceci se produit même si l'ovocyte donneur et le receveur ne proviennent pas de la même espèce ou du même groupe zoologique (KISHIMOTO *et al.* 1977; REYNHOUT *et al.* 1974). Ce facteur n'est donc pas spécifique des ovocytes d'une espèce donnée mais il ne semble pas non plus spécifique de la méiose puisque l'injection de cytoplasme de cellules HeLa en mitose dans des ovocytes de Batracien déclenche leur maturation (SUNKARA *et al.* 1979). D'autre part, la transduction du signal hormonal implique des mouvements de calcium (DOREE *et al.* 1978) comme dans la stimulation de nombreux autres processus cellulaires. Des phosphorylations cyclic-AMP dépendantes comme celles contrôlant la croissance des cellules en culture ou l'effet des neuromédiateurs (GREENGARD, 1978) sont également impliquées dans la maturation (MALLER *et al.* 1977 a et b, DOREE *et al.* 1981$_b$). Il apparaît donc important d'étudier la réinitiation de la méiose sur des espèces les plus diverses possibles pour séparer les processus généraux de ceux particuliers à chaque espèce.

Le groupe des Annélides polychètes est particulièrement favorable à l'étude de la diversité des modes de réinitiation de la méiose. En effet, certains polychètes telles les *Nereis* pondent des ovocytes en prophase I qui n'évoluent pas jusqu'à la fécondation alors que chez d'autres la fécondation n'est possible qu'en métaphase I. Pour ceux-ci la maturation se pro-

duit soit juste avant la ponte sous l'influence d'un stimulus hormonal comme chez l'Arénicole (HOWIE, 1966) soit au contact de l'eau de mer, chez le Chaetoptère par exemple (GOLDSTEIN, 1953). Il existe aussi un certain nombre de polychètes tubicoles qui pondent lorsqu'on les extrait de leur tube. Un pourcentage variable de leurs ovocytes passe alors de prophase I en métaphase I, ce qui suggère que le stimulus réel de maturation est inconnu, c'est le cas de *Pomatoceros* (CRAGG, 1939)et de *Hydroides* (PASTEELS, 1935) par exemple. Les espèces présentant un second blocage en métaphase I, c'est le cas de *Sabellaria*, peuvent ainsi permettre de dissocier les événements liés uniquement à la transition prophase-métaphase de ceux liés à l'achèvement de la méiose (émission des globules polaires, formation du pronucleus femelle). Elles permettent aussi d'étudier l'établissement d'un blocage en métaphase avec l'éventuelle apparition d'un facteur cytostatique (CSF) qui, jusqu'à présent, a été surtout étudié chez les Amphibiens (MASUI *et al.* 1971).

Dans ce contexte, l'étude de la réinitiation de la méiose chez *Sabellaria alveolata* (L.) présente un certain nombre d'intérêts. Ce polychète de la famille des Sabellariidés est d'une récolte facile car ses tubes de sable aggloméré forment de petits récifs découverts à marée basse. La période de maturité sexuelle dure environ neuf mois, avec un maximum pendant les mois d'été (GRUET, 1982, thèse de doctorat d'état). Les sexes sont séparés, la ponte est déclenchée par l'extraction du tube et à la bonne saison, il suffit de quelques animaux pour obtenir un millilitre d'ovocytes.

La première étude détaillée de la maturation des ovocytes de *Sabellaria alveolata* fut faite par FAURE-FREMIET en 1924. Il observa que les ovocytes étaient pondus en prophase I et passaient immédiatement en métaphase I où ils restaient bloqués jusqu'à ce qu'ils soient fécondés. Il en conclut que la maturation était déclenchée par le contact avec l'eau de mer. C'est seulement en 1968 que D.P. WILSON signala que dans certaines pontes, les ovocytes restaient bloqués en prophase mais étaient néanmoins fécondables et capables de donner des larves normales.

Les premières recherches faites à Roscoff dans le cadre d'un D.E.A. et d'une thèse de 3ème cycle sur la parthénogénèse artificielle chez *Sabellaria* (PEAUCELLIER, 1971 et 1973) confirmèrent les observations de WILSON. Elles permirent également de mettre en évidence dans les liquides internes des adultes, une substance, toujours présente, capable de déclencher la ma-

turation des ovocytes. Il devenait donc possible de déclencher à volonté la réinitiation de la méiose qui est l'objet du présent travail.

Il a ainsi été possible de compléter en premier lieu la description de la méiose, notamment au niveau ultrastructural où seule la réaction corticale avait été décrite (PASTEELS, 1965). En second lieu, il a été possible d'isoler et de purifier le facteur déclenchant la maturation qui s'est révélé être une série d'enzymes protéolytiques, abondantes dans le tube digestif des adultes. Ceci a permis d'étudier en troisième lieu le rôle que peuvent jouer ces protéases dans les conditions naturelles par rapport à la fécondation.

En dernier lieu, plusieurs aspects physiologiques de la réinitiation de la méiose ont été étudiés. En particulier le rôle du calcium et des modifications de la perméabilité membranaire ont été mis en évidence, ainsi qu'une libération d'acide, et une augmentation des phosphorylations.

1ère PARTIE

DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA MEIOSE

La description *"in vivo"* de la méiose des ovocytes de *Sabellaria alveolata* a été faite par DE QUATREFAGES en 1848 mais c'est à FAURE-FREMIET (1924) que l'on doit les premières observations cytologiques utilisables. L'ovogenèse y est bien décrite : les ovocytes se différencient à partir de l'épithélium coelomique au niveau de digitations vasculaires et s'en détachent lorsqu'ils ont atteint leur taille maximale, pour s'accumuler dans la cavité coelomique. Ces ovocytes qui ne sont entourés d'aucune cellule folliculaire sont évacués par les néphridies lors de la ponte. La méiose est également soigneusement décrite mais la technique de fixation et de coloration employée ne permettait apparemment pas une observation suffisamment précise des chromosomes et a conduit à une interprétation erronée de la formule chromosomique. De même les recherches de DEHORNE (1911 et 1913) sur *Sabellaria spinulosa* à partir de coupes histologiques ont abouti elles aussi à des interprétations fausses pour certains stades. Par contre, avec la méthode de coloration *"in toto"* au carmin acétique et celle des écrasements,utilisées lors des études préliminaires, l'observation précise des chromosomes ne posait plus de problème et les inexactitudes de la formule chromosomique ont été facilement corrigées (PEAUCELLIER, 1974).

Au niveau ultrastructural, l'ovocyte de *Sabellaria alveolata* a été étudié par PASTEELS, mais il n'en a publié que des données fragmentaires dans une étude comparative sur la fécondation vue au microscope électronique (PASTEELS, 1965). Il fournit néanmoins une bonne description de la réaction corticale, qui marque le début de la maturation, et indique l'ultrastructure du spermatozoïde ainsi que de corps multivésiculaires présents dans le cytoplasme de l'ovocyte. Sur des espèces américaines voisines, quelques observations ultrastructurales ont également été publiées. La formation de la membrane vitelline a été étudiée sur *Sabellaria vulgaris* (FRANKLIN, 1966) et *Phragmatopoma lapidosa* (ECKELBARGER, 1978). L'ovogénèse de *Phragmatopoma* a également été décrite (ECKELBARGER, 1979). Il a donc paru utile de compléter ces données fragmentaires.

Matériel et méthodes

Les *Sabellaria alveolata* proviennent de St Michel-en-grèves à la bordure est de la grande plage de St Efflam. Sur les rochers en-dessous du niveau de mi-marée on trouvait des colonies prospères jusqu'à l'été 1981 où elles furent presque toutes détruites, sans doute sous l'action de l'homme.

Les blocs sont conservés en aquarium d'eau courante et les animaux restent en parfait état pendant plus d'un mois.

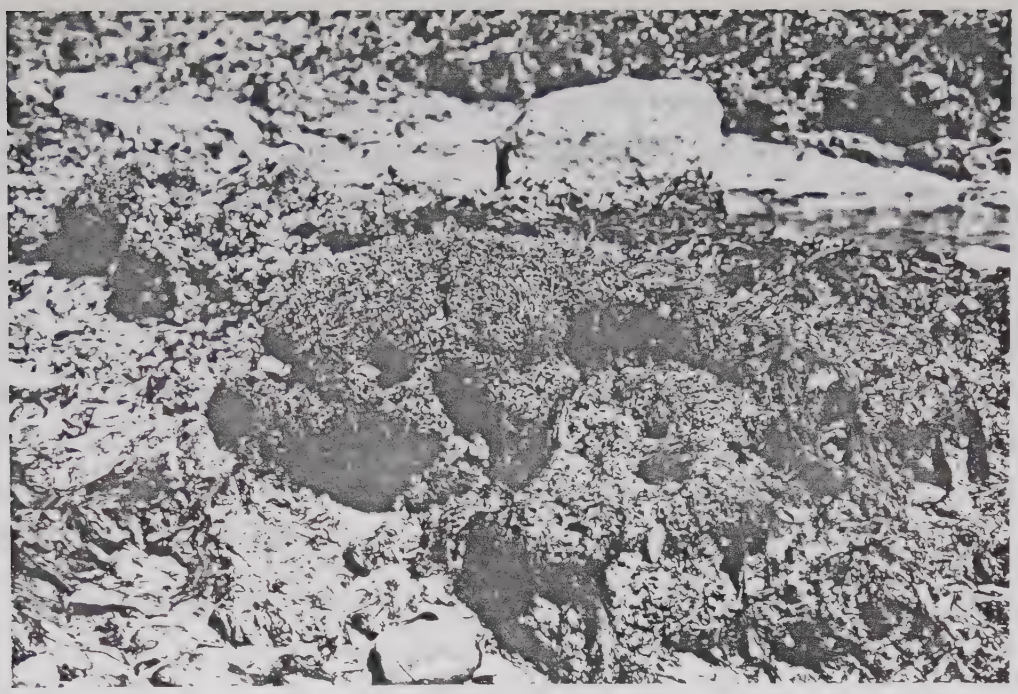
Pour l'obtention des gamètes, les animaux sont extraits de leur tube en effritant les blocs à la main. Les femelles, reconnaissables à la couleur rose que leur donne les ovocytes qu'elles contiennent, sont prises avec des pinces, rincées quelques secondes sous le robinet d'eau douce pour éliminer les spermatozoïdes qui pourraient se trouver sur leur corps; elles sont ensuite passées sous le robinet d'eau de mer et mises à pondre dans des coupelles ou des boîtes de pétri contenant quelques millilitres d'eau de mer.

La plupart des expériences sont faites dans une eau de mer artificielle inspirée de la formule de LYMAN & FLEMING (1940) et légèrement tamponnée : NaCl 23,48 g/l; $MgCl_2$ 4,98 g/l; SO_4Na_2 3,92 g/l; $CaCl_2$ 1,1 g/l; KCl 0,66 g/l $NaHCO_3$ 0,19 g/l; acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES) 20 mM/l. Le pH est ajusté à 8.0 avec de la soude.

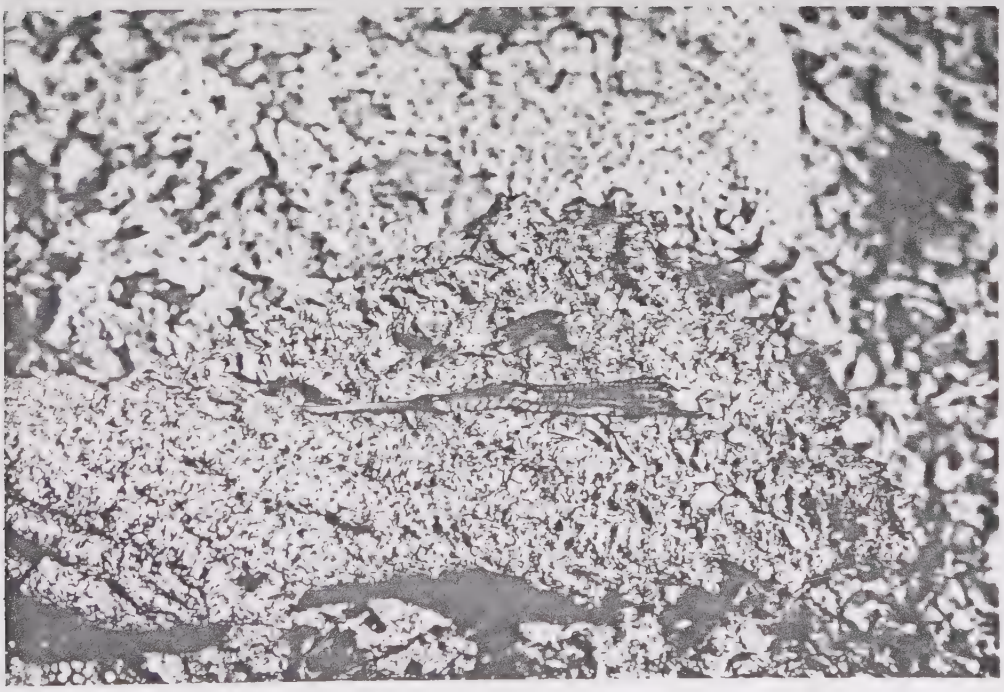
Pour l'obtention d'ovocytes bloqués en prophase, il est nécessaire d'inhiber les protéases, provenant de la défécation des animaux pendant la ponte, en ajoutant 2 g/l d'inhibiteur de la trypsine extrait des graines de soja (SBTI, Sigma type I-S). Les femelles sont mises à pondre isolément dans 1 à 4 ml d'eau de mer avec SBTI puis enlevées. Une heure après les pontes sont observées à la loupe binoculaire et celles ne présentant pas de maturations sont mélangées, centrifugées à 1.000 g pendant 30 s et resuspendues 5 fois dans de l'eau de mer artificielle sans SBTI. Ces ovocytes se conservent une journée à température ambiante (18 à 20°C).

Pour déclencher la maturation, les ovocytes sont additionnés de 5 µl/ml d'une solution de protéase CT à 1°/$_{oo}$ (voir 2ème partie).

Pour la fécondation d'ovocytes en prophase sans intervention de protéase il est nécessaire de laver les spermatozoïdes. Des mâles, reconnaissables à la couleur blanche de leur abdomen, sont mis dans de l'eau de mer contenant



Vue d'ensemble d'un petit "récif" d'hermelles (*Sabellaria alveolata*) à St Michel en Grèves.



Deux animaux extraits de leur tube, sur un fragment de récif. On distingue, de droite à gauche : la couronne operculaire, dorée ; le tube digestif, brun, bien visible sur toute la longueur du corps ; le fin post-abdomen, beige, ici disposé dans le prolongement du corps, alors que dans les conditions normales il est replié ventralement.

du SBTI (2 g/l). Deux ml de la suspension de spermatozoïdes ainsi obtenue sont déposés sur 3 ml d'eau de mer artificielle contenant 20% de Ficoll 400 (Pharmacia) et 10 mg/l de SBTI, puis centrifugés 5 min à 10.000 g. Le surnageant est aspiré et le culot de spermatozoïdes resuspendu dans 4 ml d'eau de mer puis recentrifugé. Le culot est resuspendu dans l'eau de mer et la concentration en spermatozoïdes est évaluée par mesure spectrophotométrique à 550 nm. Un comptage à l'hématimètre a montré qu'une suspension de 10^7 spermatozoïdes/ml a une densité optique de 0,164. Sauf indication contraire, le volume de suspension de spermatozoïdes ajouté aux ovocytes est calculé pour donner une concentration finale de 10^7 spermatozoïdes par ml.

Les ovocytes destinés à l'observation cytologique *in toto* sont fixés par addition de 0,1 ml de suspension d'ovocytes à 5 ml de fixateur de Carnoy (Acide acétique 1 volume, chloroforme 3 volumes, Ethanol anhydre 6 volumes). Après un temps de fixation de 30 min à plusieurs heures, le tube est centrifugé et le fixateur remplacé par du carmin acétique : solution mère de Carmin 40 à saturation dans l'acide acétique 45%, diluée 10 fois au moment de l'emploi avec de l'acide acétique 45%. Les ovocytes peuvent être observés quelques heures après, directement dans le carmin acétique; ils s'y conservent d'ailleurs fort bien plusieurs jours sans surcoloration gênante.

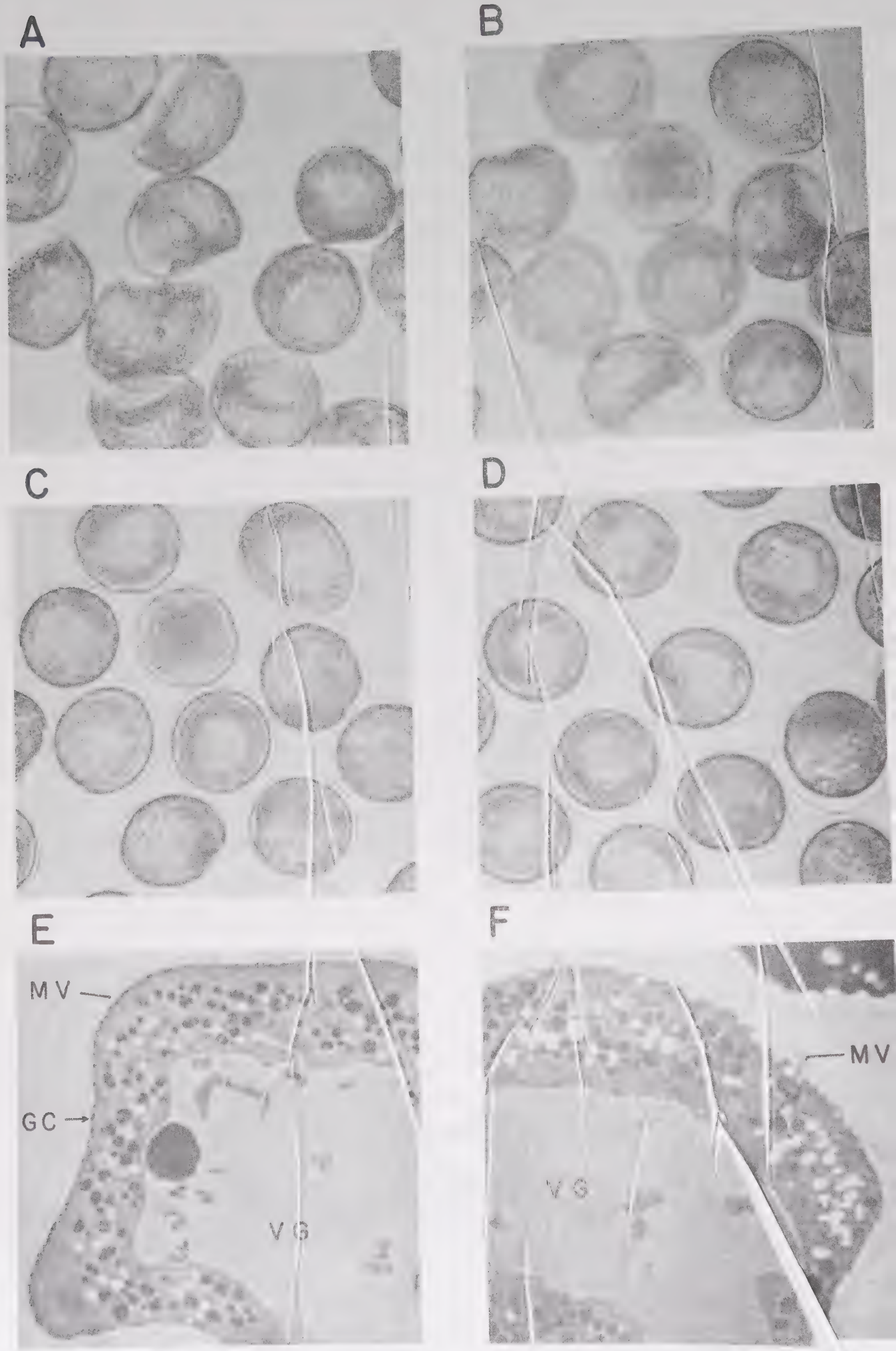
Les ovocytes peuvent aussi être colorés *in toto* par la technique usuelle de Feulgen, avec pour seules modifications que les ovocytes sont transférés d'une solution à l'autre par centrifugation et sont finalement remis en suspension dans l'acide acétique à 45% qui les fait gonfler et facilite l'observation.

L'histologie à la paraffine n'a été que rarement utilisée car le vitellus rend difficile l'obtention de coupes fines. Le passage dans l'acétate d'isoamyle facilite notablement la coupe (J.A.M. VAN DEN BIGGELAAR, communication personnelle) : après deshydratation à l'éthanol absolu, les ovocytes sont laissés 25 min dans un mélange d'acétate d'isoamyle (1 vol) et d'éthanol (1 vol) puis dans l'acétate d'isoamyle pur (1 bain de 3 h puis 1 bain de 12 h) avant les bains de paraffine. Une bonne visualisation des asters et centrosomes a été obgenue par fixation avec le mélange de ZENKER et coloration à l'hématoxyline au fer : mordançage par l'alun de fer (5%) pendant 24 h, coloration à l'hématoxyline de REGAND 24 h, différenciation à l'alun de fer (2%) pendant 5 min (MARTOJA *et al.* 1967).

Comme cela est fréquent avec le matériel marin, il a été nécessaire d'essayer un grand nombre de fixateurs pour la microscopie électronique. Le premier à avoir fourni des résultats satisfaisants, sauf pour les microtubules, est un mélange de paraformaldehyde (2%) et glutaraldehyde (2,5%) dans de l'eau de mer artificielle (30%) et tamponné par 0,1 M/l de cacodylate de sodium à pH 7,5. Après 1 h de fixation à 4°C, et 3 lavages de 5 min avec de l'eau de mer tamponnée par 0,1 M de cacodylate, les ovocytes sont post-fixés 1 h à 4°C dans de l'eau de mer contenant 1% de tétroxyde d'osmium et 0,1 M/l de cacodylate à pH 7,5. Les ovocytes sont ensuite lavés 5 min dans l'eau de mer tamponnée puis deshydratés à l'éthanol (30%, 50%, 70%, 95%, 5 min chaque et 100% " x 20 min) et inclus dans le mélange de SPURR (1969), d'abord dilué avec 50% puis 30% d'éthanol absolu (30 min chaque), ensuite pur (1 bain de 1 h et 1 de 12 h) et finalement polymérisé 12 h à 70°C. C'est seulement sur la fin du présent travail qu'une bonne fixation des microtubules des ovocytes a été obtenue par la technique de ASNES & SCHROEDER (1979). Le fixateur est un mélange de glutaraldehyde (2%) et d'acide osmique (1%) dans un tampon acétate de sodium (0,4 M/l) à pH 6,0. L'acide osmique, en solution aqueuse, est ajouté quelques secondes avant l'addition des ovocytes. Après 1 h de fixation à 10°C les ovocytes sont deshydratés et inclus dans le mélange de SPURR.

Les blocs sont coupés avec des couteaux de verre sur un ultramicrotome LKB (Ultrotome III). Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine (ITO *et al.* 1963) et les coupes fines à l'acétate d'uranyle et citrate de plomb (REYNOLDS, 1963). Les coupes ont été observées avec un microscope Hitachi à 70 kV et dernièrement avec un microscope Philips EM 300 à 80 kV.

PLANCHE I



Réaction corticale

L'ovocyte en prophase I a une forme irrégulière avec un diamètre moyen de 70 µ. La volumineuse vésicule germinative forme une tache plus claire au centre de l'ovocyte, sa forme est, elle aussi, irrégulière (planche I, A). Lorsque la maturation est déclenchée, le premier signe visible *in vivo* est le décollement de l'enveloppe superficielle appelée "membrane vitelline" (FAURE-FREMIET, 1924) ou "chorion" (PASTEELS, 1965). Cette réaction corticale se manifeste dès la première minute de la réinitiation de la méiose (Planche I, B). Dans les minutes qui suivent, l'espace entre la membrane vitelline et le cytoplasme s'accroît tandis que l'ovocyte devient sphérique (Planche I,C). Passé 10 min on n'observe plus de changement : la membrane vitelline est largement décollée avec de nombreux replis tandis que l'ovocyte est parfaitement sphérique (Planche I, D).

En microscopie optique on distingue à la périphérie de l'ovocyte en prophase une couche de corpuscules colorés par le bleu de toluidine appelés "granules corticaux" (Planche I, E). Ces granules corticaux ont totalement disparu une minute et demie après le déclenchement de la maturation mais à leur place on distingue de nombreuses alvéoles (Planche I, F). Dans les minutes qui suivent la surface de l'ovocyte s'égalise et on ne distingue plus les alvéoles.

LEGENDE DE LA PLANCHE I

Observation de la réaction corticale en microscopie optique

A : ovocytes bloqués en prophase I; *in vivo;* x 300.

B,C,D : ovocytes dont la méiose a été réinitiée par addition de sucs digestifs d'adultes; *"in vivo"* 1 min (B), 3 min (C) et 11 min (D) après l'addition de sucs digestifs; x 300.

E,F : coupe semi-fine colorée au bleu de toluidine d'un ovocyte bloqué en prophase I (E) et d'un ovocyte soumis à l'action de sucs digestifs depuis 1 min 30 sec (F). VG, vésicule germinative; MV, membrane vitelline, GC, granules corticaux. Contraste de phase; x 1.800.

En microscopie électronique, la membrane vitelline montre plusieurs couches (Planche II, A). La couche la plus externe est constituée de sphérules de 0,12 µ de diamètre, presque jointives. Ces sphérules sont fixées par leur base à une couche fibreuse épaisse de 0,38 µ avec deux zones plus opaques aux électrons du côté externe. En dessous se trouve une autre couche fibreuse, plus lache, épaisse d'environ 0,18 µ et il reste un espace apparemment vide d'environ 0,16 µ entre la membrane cytoplasmique et la membrane vitelline. De nombreuses microvillosités (environ 10 par µ²) pénètrent dans la membrane vitelline sans la traverser totalement. Elles ont une longueur de 0,4 à 0,5µ pour un diamètre de 0,1µ avec un étranglement à la base. FRANKLIN (1966) a montré chez *Sabellaria vulgaris* que les sphérules de la membrane vitelline se forment au cours de l'ovogénèse par étranglement de l'extrêmité des microvillosités qui à ce stade ont une forme en chandelier, ce qui explique qu'il y ait finalement plus de sphérules que de microvillosités. Cette couche de sphérules se retrouve aussi chez un autre Sabellariidé, *Phragmatopoma lapidosa* (ECKELBARGER, 1978) et d'autres polychètes comme *Pomatoceros triqueter* (GWYNN *et al.* 1971), *Sternaspis* (NOTABARTOLO, 1970), *Mercierella enigmatica* (SICHEL, 1965) ainsi que chez l'échiurien *Urechis caupo* (GOULD *et al.* 1975). La couche de sphérules rend la membrane vitelline non élastique et est responsable de la forme irrégulière de ces ovocytes. En effet, dans de l'eau de mer sans calcium, les sphérules se détachent et les ovocytes prennent immédiatement une forme sphérique. Les granules corticaux contiennent un matériel homogène très dense et sont entourés d'une membrane continue; ils sont probablement formés par l'appareil de Golgi comme chez *Phragmatopoma* (ECKELBARGER, 1979) et l'oursin. Leur forme est généralement ovoïde pouvant atteindre 0,7 µ de long pour 0,2 à 0,3 µ de large. Ils sont disposés de manière irrégulière juste sous la membrane cytoplasmique; leur densité moyenne est de 1 granule par µ².

LEGENDE DE LA PLANCHE II

Observation en microscopie électronique d'ovocytes bloqués en prophase I.

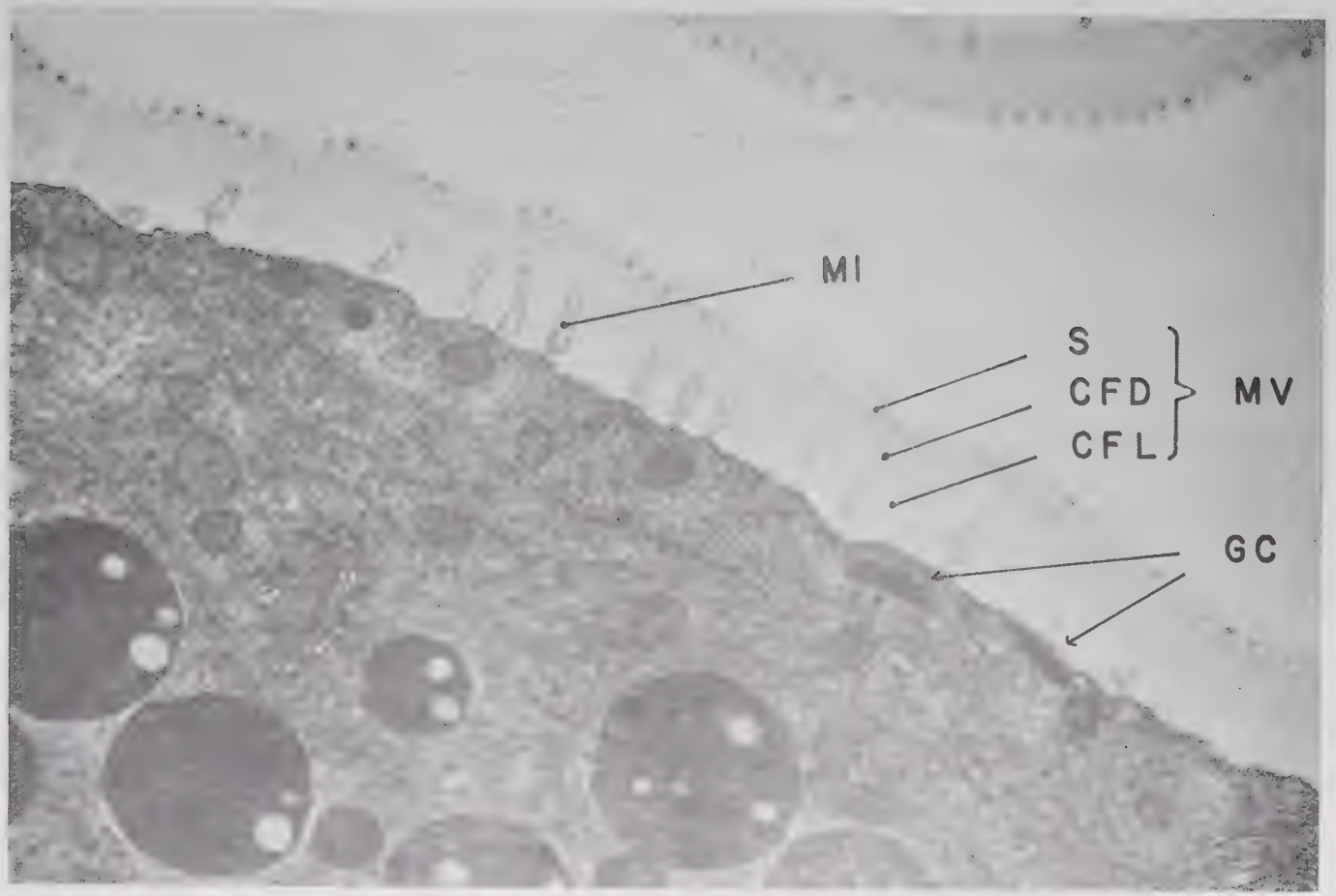
A : périphérie d'un ovocyte en coupe transversale.
Fixation en 2 temps, x 20.000.

B : coupe oblique montrant la disposition des granules corticaux, des microvillosités et des sphérules de la membrane vitelline.
Fixation en 2 temps, x 20.000.

MV, membrane vitelline; S, sphérules; CFD, couche fibreuse dense; CFL, couche fibreuse lache; MI, microvillosités; GC, granules corticaux.

PLANCHE II

A



B

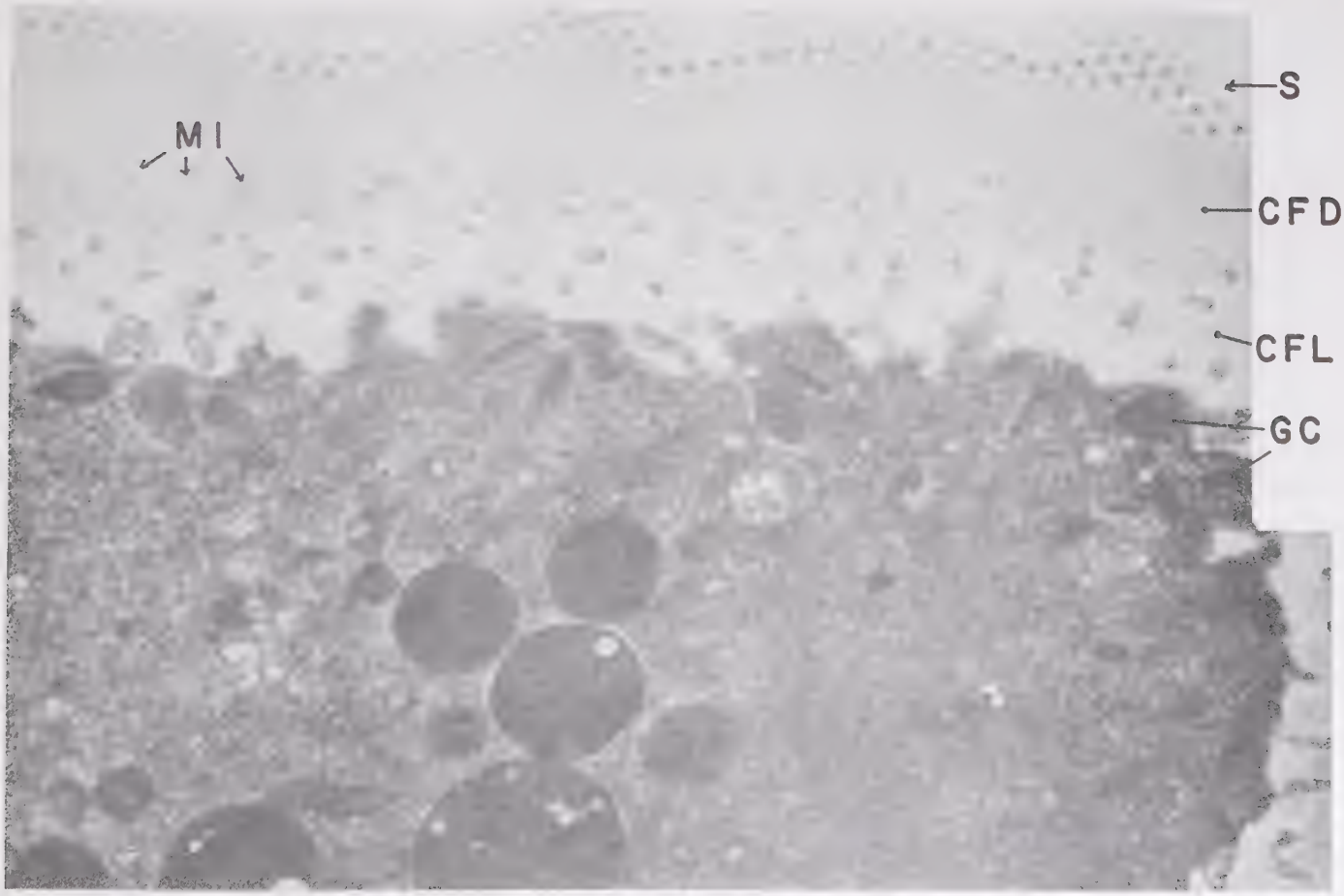
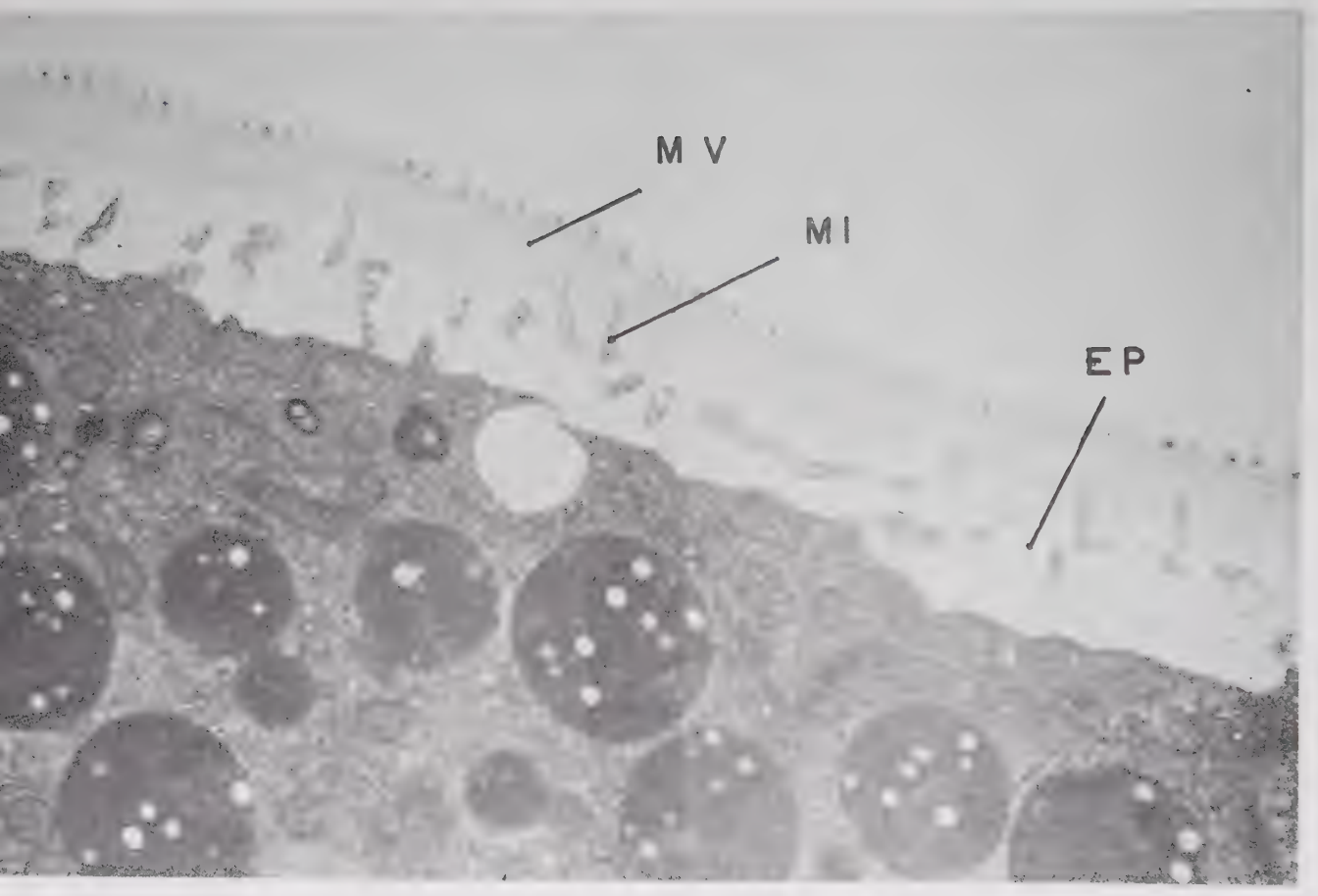
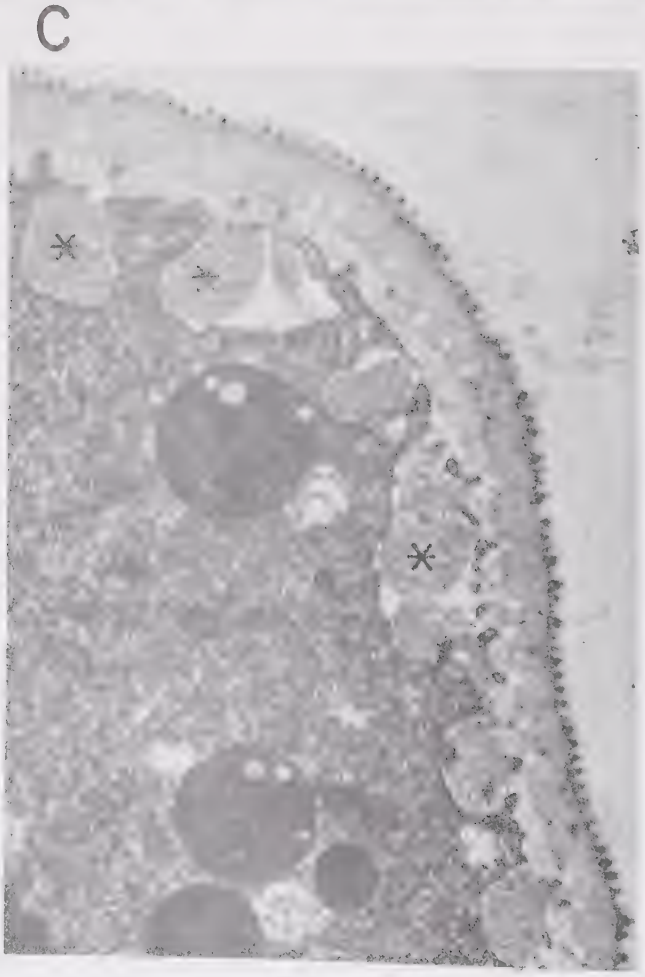


PLANCHE III





Ainsi que l'a décrit PASTEELS (1965), dans la première minute qui suit l'initiation de la maturation, les granules corticaux se gonflent et leur membrane fusionne avec la membrane cytoplasmique. Leur contenu est déversé dans l'espace situé sous le membrane vitelline et est déjà presque totalement dissous une minute et demie après l'initiation de la maturation (Planche III A). L'espace entre la membrane vitelline et la membrane cytoplasmique ("espace périvitellin") est alors augmenté d'environ 0,5 µ, mais l'extrêmité des microvillosités pénètre encore dans la couche fibreuse dense de la membrane vitelline. Ces microvillosités sont toujours,pour la plupart,reliées au cortex de l'ovocyte par des prolongements cytoplasmiques sinueux dont la membrane provient de la fusion de l'ancienne membrane cytoplasmique avec celle des granules corticaux. Entre 2 et 3 minutes après l'initiation de la maturation, l'extrêmité des microvillosités se détache de la membrane vitelline (Planche III, B) et l'espace périvitellin s'agrandit, sans doute sous l'effet de la pression osmotique résultant de la dissolution du contenu des granules corticaux. En effet, l'addition de 2 g/l de Concanavaline A (Miles) à l'eau de mer empêche le décollement de la membrane vitelline et les ovocytes maturent en gardant une forme irrégulière. En microscopie électronique, on observe que la réaction corticale a eu lieu mais que le contenu des granules corticaux ne s'est pas dissous, sans doute parce que la concanavaline maintient une réticulation entre des résidus glucidiques (Planche III, C). Par contre, il n'y pratiquement plus de microvillosités engagées dans la membrane vitelline qui ne devrait donc plus adhérer à la surface del'ovocyte. Il est aussi à noter que lorsque la réaction corticale est déclenchée dans de l'eau de mer à pH 5,5 par l'ionophore A 23187 (voir 4ème partie) les granules corticaux se rompent et leur contenu se dissout mais les microvillosités ne se détachent pas de la couche fibreuse de la membrane vitelline.

LEGENDE DE LA PLANCHE III

Observation au microscope électronique d'ovocytes dont la maturation a été déclenchée par addition de sucs digestifs. Fixation en 2 temps.

A : ovocyte 1 min 30 sec après réinitiation de la méiose. x 20.000.

B : ovocyte 3 min 40 sec après réinitiation de la méiose : on distingue dans la couche fivreuse dense de la membrane vitelline les endroits où étaient auparavant insérées les extrêmités des microvillosités (flèches); x 20.000.

C : ovocyte fixé 15 min après addition de sucs digestifs en présence de concanavalline A (2 g/l). Le contenu des granules corticaux n'est pas dissous (étoiles). x 10.000.

MV : membrane vitelline; MI : microvillosités; EP : espace périvitellin.

Cette réaction corticale est donc comparable à celle qui a été décrite lors de la fécondation de nombreux métazoaires (voir AUSTIN 1978) mais chez *Sabellaria* elle n'est pas forcément liée à la fécondation puisque les ovocytes en métaphase I sont toujours fécondables (voir 3ème partie).

Transition prophase I-métaphase I

L'observation des chromosomes chez *Sabellaria* est facilitée par leur grande taille, en revanche le vitellus est opaque et gêne les observations *"in vivo"*. Les phénomènes nucléaires de la maturation sont donc plus facilement observés après coloration *"in toto"* au carmin acétique qui colore sélectivement les chromosomes et fait gonfler les ovocytes.

Les ovocytes bloqués en prophase I sont comme dans la plupart des autres espèces (MASUI *et al.* 1979) au stade diplotène. On distingue dans la vésicule germinative les tétrades fluxueuses et grêles et un gros nucléole (Planche IV, A). Dans les minutes qui suivent l'initiation de la maturation avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, on observe une nette condensation des chromosomes (Planche IV, B). Dans le même temps, un aster se développe

LEGENDE DE LA PLANCHE IV

Observation en microscopie optique de la transition prophase I-métaphase I, déclenchée par l'addition de sucs digestifs.

A : ovocyte bloqué en prophase; carmin acétique; x 700.

B : ovocyte 9 min après l'initiation de la maturation : l'enveloppe nucléaire est encore intacte mais les chromosomes sont condensés; carmin acétique; x 700.

C : coupe semi-fine d'un ovocyte 9 min après l'initiation de la maturation : on distingue l'aster au voisinage de la vésicule germinative. Bleu de toluidine; contraste de phase; x 1.300.

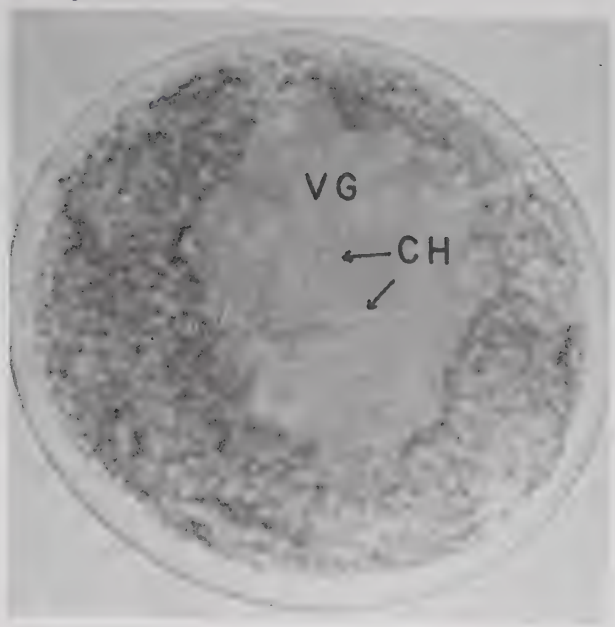
D : ovocyte dont la membrane nucléaire vient de se dissocier, 10 min après l'initiation de la maturation : l'emplacement de la vésicule germinative et le nucléole sont encore visibles. Carmin acétique; x 700.

E : ovocyte 15 min après initiation de la maturation : le fuseau est déjà formé mais les chromosomes sont encore dispersés. Carmin acétique; x 700.

F : ovocyte en métaphase I, 30 min après initiation de la maturation : les chromosomes sont regroupés en plaque métaphasique, les centrosomes sont visibles aux deux pôles du fuseau. Inclusion à la paraffine, coloration à l'hématoxyline; x 1.600.

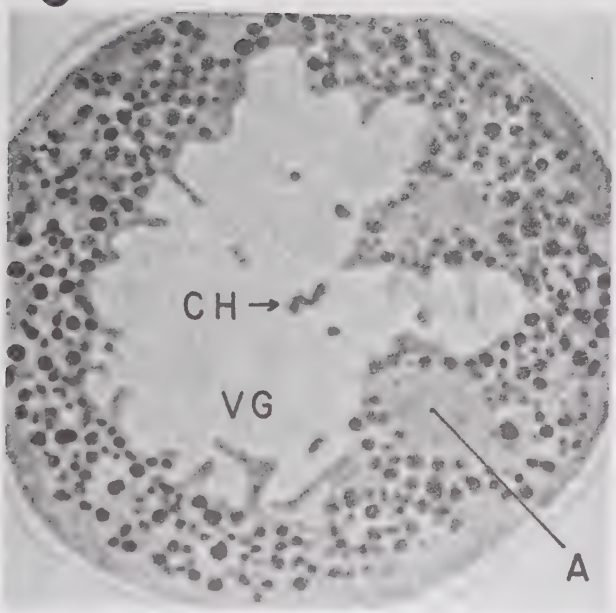
VG : vésicule germinative; CH : chromosomes; A : aster; N : nucléole; F : fuseau achromatique; C : centrosome; P : plaque métaphasique.

A



B

C



D

E

F

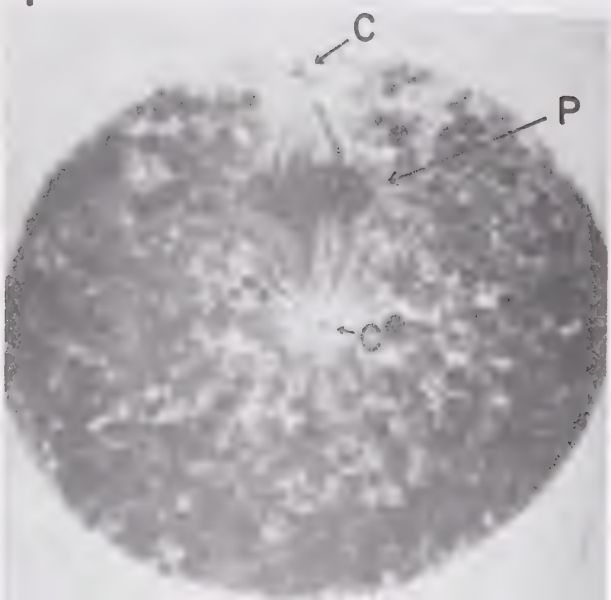
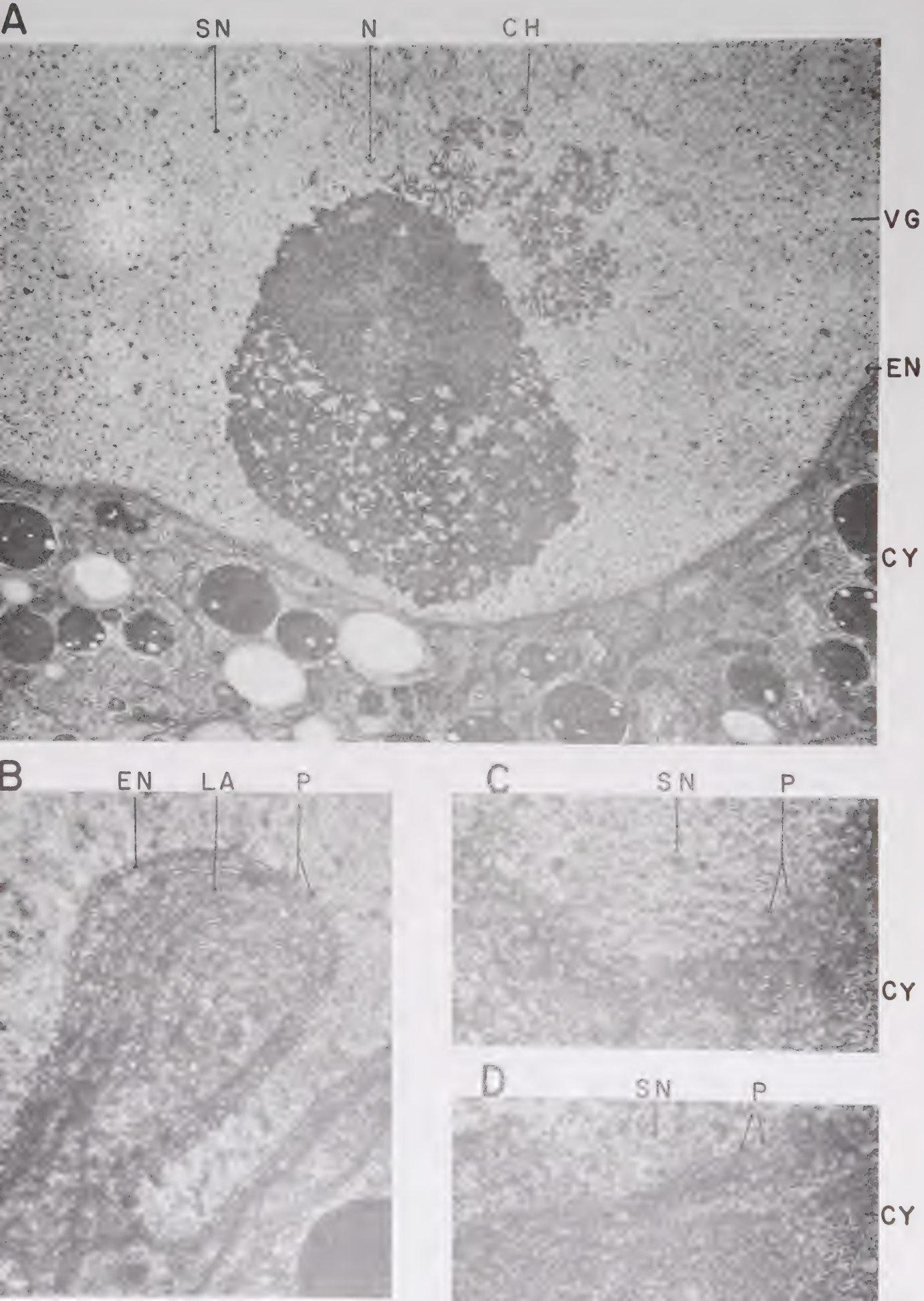


PLANCHE V



dans le cytoplasme à proximité de la vésicule germinative (Planche IV, C). Le temps au bout duquel se rompt l'enveloppe nucléaire n'est jamais parfaitement identique pour les ovocytes d'un même lot et dépend aussi de la température. Il est en moyenne de 9 minutes à 18°C mais peut être réduit à 7 min à 22°C, ou allongé jusqu'à 11 min à 16°C. Le suc nucléaire ne se mélange pas immédiatement avec le cytoplasme et le nucléole reste visible (Planche IV, D). Dans les cinq minutes suivantes la zone de l'ancienne vésicule germinative fixe le carmin acétique et prend un aspect granuleux, les chromosomes atteignent leur condensation maximum, le nucléole régresse et l'aster se dédouble (Planche IV, E). Les chromosomes se regroupent progressivement à l'équateur du fuseau dont la taille s'accroît. Environ 20 min après l'initiation de la maturation, la plaque métaphasique est bien formée, le fuseau diminue ensuite de taille et se place en position excentrée, un de ses poles juste sous la membrane cytoplasmique (Planche IV, F). Passé 30 minutes après l'initiation de la maturation, l'ovocyte vierge n'évolue plus puis se cytolyse au bout de quelques heures.

En microscopie électronique, l'ovocyte en prophase présente une ultrastructure des plus classiques (Planche V, A). Le suc nucléaire est peu dense avec de fines granulations de l'ordre du centième de micron dans une trame hétérogène résultant sans doute de la coagulation de macromolécules à la fixation. Les chromosomes formés d'un entrelacs de fibres laches se présentent en coupe sous forme de zone granuleuses. Le nucléole d'environ 5 µ de diamètre comprend deux parties, l'une homogène, l'autre d'allure spongieuse.

LEGENDE DE LA PLANCHE V

Observation en microscopie électronique d'ovocytes bloqués en prophase I.

A : Périphérie de la vésicule germinative montrant le nucléole et un chromosome. Fixation en 2 temps; x 12.700.

B : Détail d'une coupe perpendiculaire à l'enveloppe nucléaire. On distingue les pores nucléaires et des lamelles annelées dans le cytoplasme. Fixation en 2 temps; x 30.000.

C : Détail d'une coupe oblique de l'enveloppe nucléaire montrant les pores. Fixation en 2 temps; x 40.000.

D : coupe oblique de l'enveloppe nucléaire d'un ovocyte fixé par la méthode en 1 temps; x 40.000.

VG : vésicule germinative; SN : suc nucléaire; N : nucléole; CH : chromosomes; EN : enveloppe nucléaire; Cy : cytoplasme; LA : lamelles annelées; P : pores nucléaires.

L'enveloppe nucléaire est percée de nombreux pores (environ 50 par μ^2) de 600 Å de diamètre interne (Planche V, B, C, D). Elle est par endroits en continuité avec l'ergastoplasme, parfois organisé en lamelles annelées (Planche V, B). Une ultrastructure similaire est observée après fixation des ovocytes par la méthode en un seul temps (Planche V, D). Il n'y a presque pas de changement dans l'ultrastructure pendant les 9 min qui suivent l'initiation de la maturation. Il semble seulement que l'enveloppe nucléaire présente davantage de replis et des microtubules astériens apparaissent dans le cytoplasme jusqu'à proximité de l'enveloppe nucléaire (Planche VI, A). Il n'y a pas de diminution évidente du nombre de pores nucléaires (Planche VI, B). Les chromosomes gardent la même structure mais sont seulement plus condensés (Planche VI, C).

LEGENDE DE LA PLANCHE VI

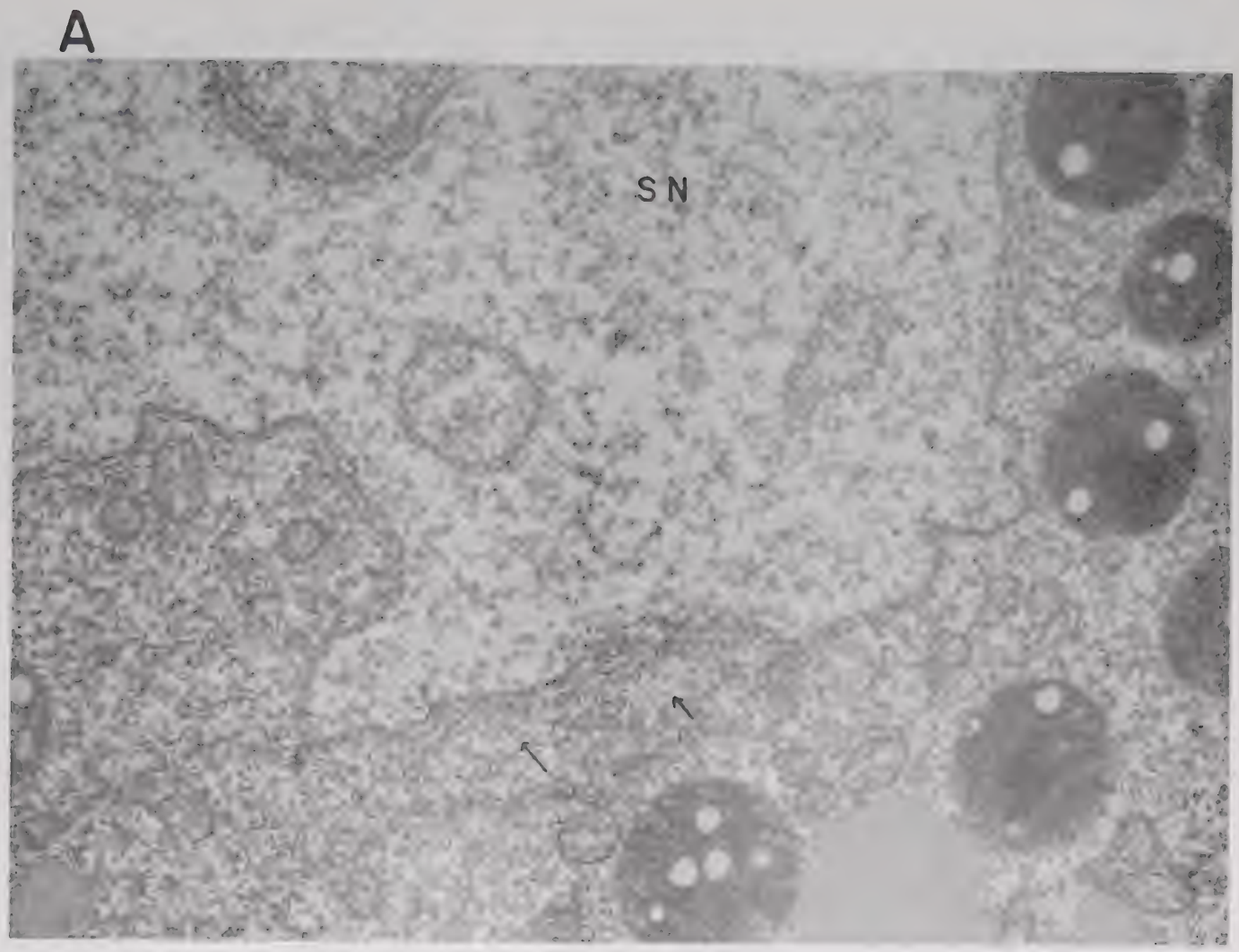
Observation en microscopie électronique d'ovocytes en prophase I traités depuis 9 min par des sucs digestifs. Fixation en 1 temps.

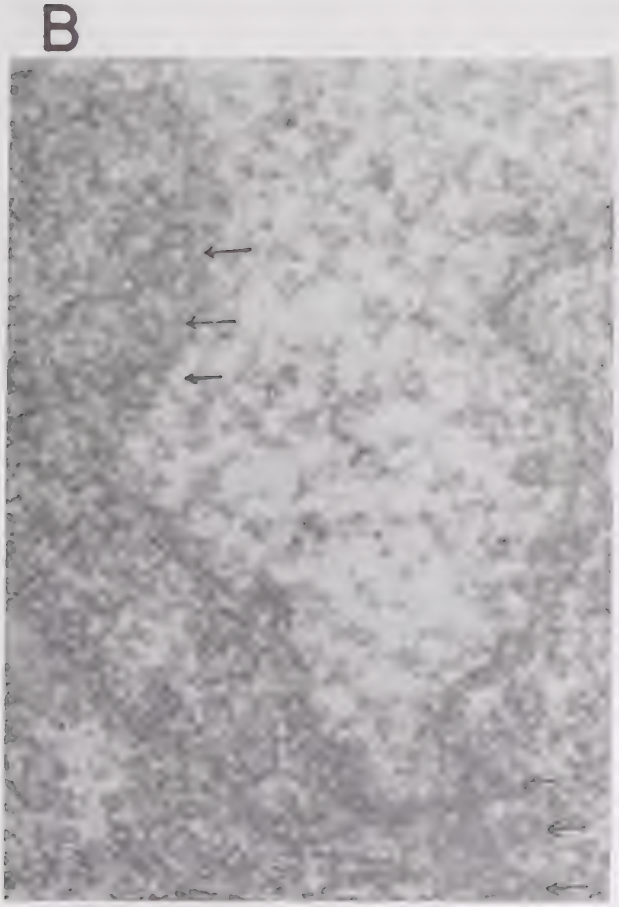
A : Périphérie de la vésicule germinative. On distingue des microtubules (flèches) à proximité de l'enveloppe nucléaire. X 20.000.

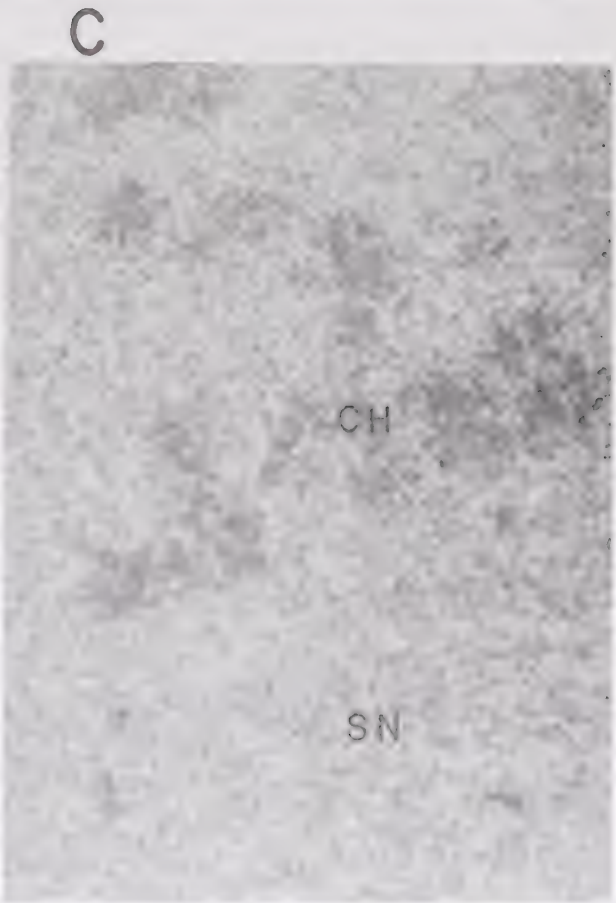
B : coupe oblique de l'enveloppe nucléaire. La fréquence des pores nucléaires (flèches) semble inchangée. x 40.000.

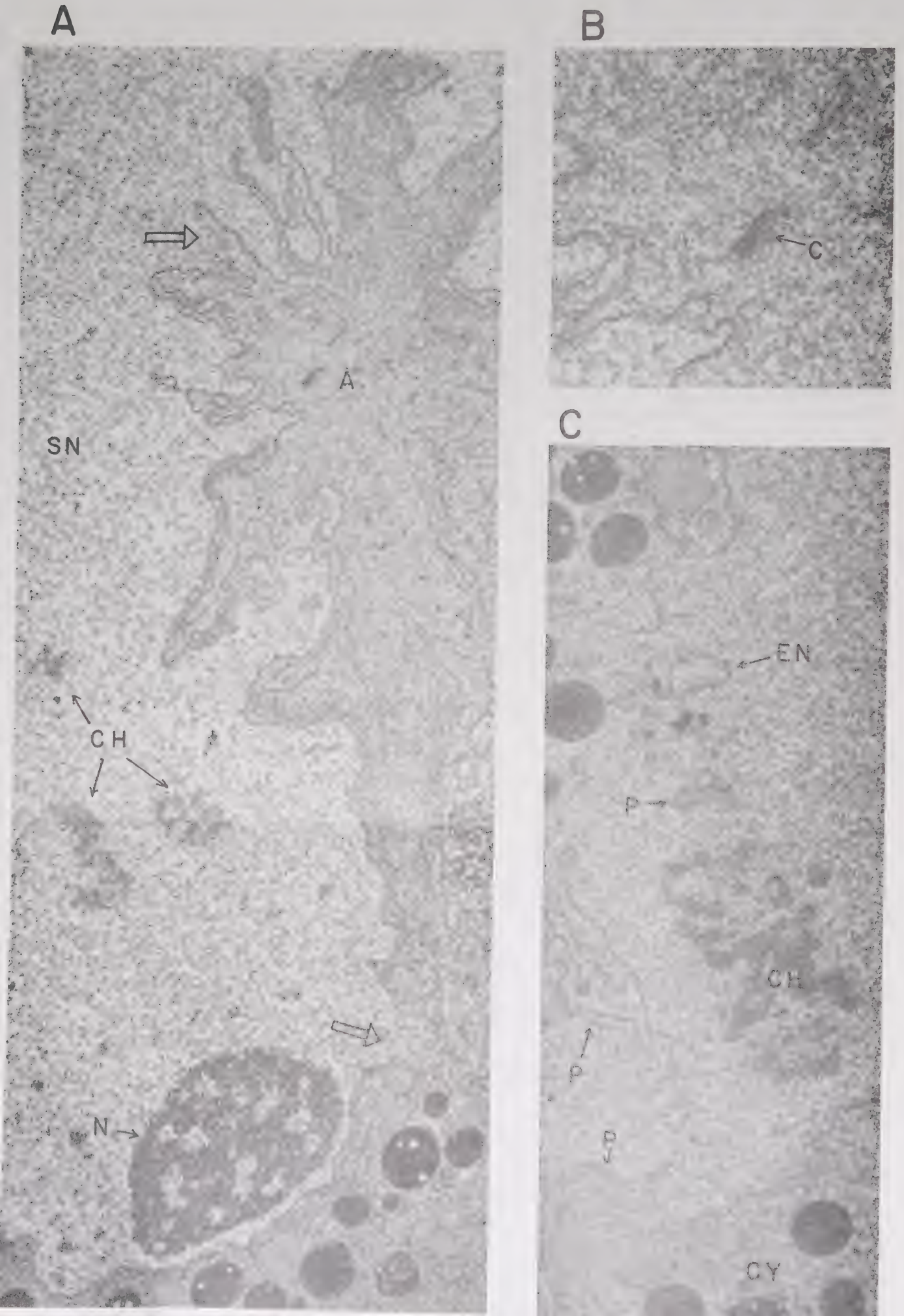
C : coupe d'un chromosome. X 12.700.

SN : suc nucléaire; Ch : chromosome.


A
SN


B


C
CH
SN


A
SN
A
CH
N
B
C
C
EN
P
CH
P
P
CY

La rupture de l'enveloppe nucléaire est très rapide car il est très rare de trouver un ovocyte avec une vésicule germinative seulement partiellement rompue. Dans ce cas, on observe que la rupture est plus avancée au niveau de l'aster comme c'est le cas dans d'autres espèces (MASUI *et al.*, 1979) (Planche VII,A). Les déchirures semblent résulter d'une vésicularisation locale de l'enveloppe nucléaire et n'avoir aucun rapport direct avec les microtubules (Planche, VII,B). Ces déchirures isolent de grands lambeaux d'enveloppe nucléaire et le nucléoplasme devient immédiatement plus dense bien qu'il ne soit pas encore mélangé avec le cytoplasme (Planche VII, C). Des restes de membrane nucléaire, reconnaissables à leurs pores, sont encore visibles plusieurs minutes après la rupture de l'enveloppe nucléaire alors que le nucléoplasme se mélange au cytoplasme et que les chromosomes achèvent de se condenser (Planche VIII, A,B).

LEGENDE DE LA PLANCHE VII

Observation en microscopie électronique d'ovocytes traités depuis 11 min par des sucs digestifs. Fixation en 1 temps.

A : ovocyte fixé au début de la rupture de l'enveloppe nucléaire. On distingue l'aster et plusieurs points de rupture de l'enveloppe nucléaire (flèches). Le suc nucléaire a encore le même aspect que dans l'ovocyte en prophase. x 7.500.

B : Détail de la zone astérienne de la micrographie précédente. On distingue un centriole entouré de microtubules (flèches).

C : ovocyte dont l'enveloppe nucléaire est complètement rompue. Le suc nucléaire est plus opaque mais pas encore mélangé avec le cytoplasme. On distingue les lambeaux de l'enveloppe nucléaire avec des pores nucléaires. x 10.000.

SN : suc nucléaire; Ch : chromosomes; N : nucléole; A : aster;
C : centriole; EN : enveloppe nucléaire; P : pores nucléaires;
Cy : cytoplasme.

Les asters sont bien développés et les centrioles ont la structure classique (Planche VIII, C). Trois à cinq minutes après la rupture de l'enveloppe nucléaire, les chromosomes, totalement condensés, commencent à être associés à des fragments de réticulum endoplasmique (Planche VIII, D). Ils sont toujours dispersés autour des asters (Planche IX, A). Lorsque cinq minutes plus tard ils sont regroupés à l'équateur du fuseau, ils sont presque totalement enveloppés de réticulum endoplasmique (Planche IX, B,C,D). Cet emballage des chromosomes ne semble pas lié au blocage en métaphase I puisqu'on le retrouve dans les ovocytes dont la maturation a été déclenchée par fécondation, qui eux continueront leur méiose (Planche IX, D).

On retrouve donc dans la maturation des ovocytes de *Sabellaria* les processus connus chez d'autres espèces, comme la condensation des chromosomes avant rupture de la vésicule germinative ou le plissement de l'enveloppe nucléaire (MASUI *et al.*, 1979).

LEGENDE DE LA PLANCHE VIII

Observation en microscopie électronique d'ovocytes traités depuis 12 min par des sucs digestifs. Fixation en 1 temps.

A : vue de l'ancienne zone nucléaire. On distingue l'aster avec un centriole, à proximité d'un chromosome. Le suc nucléaire est partiellement mélangé avec le cytoplasme puisqu'on y observe des mitochondries et quelques globules vitellins. x 10.000.

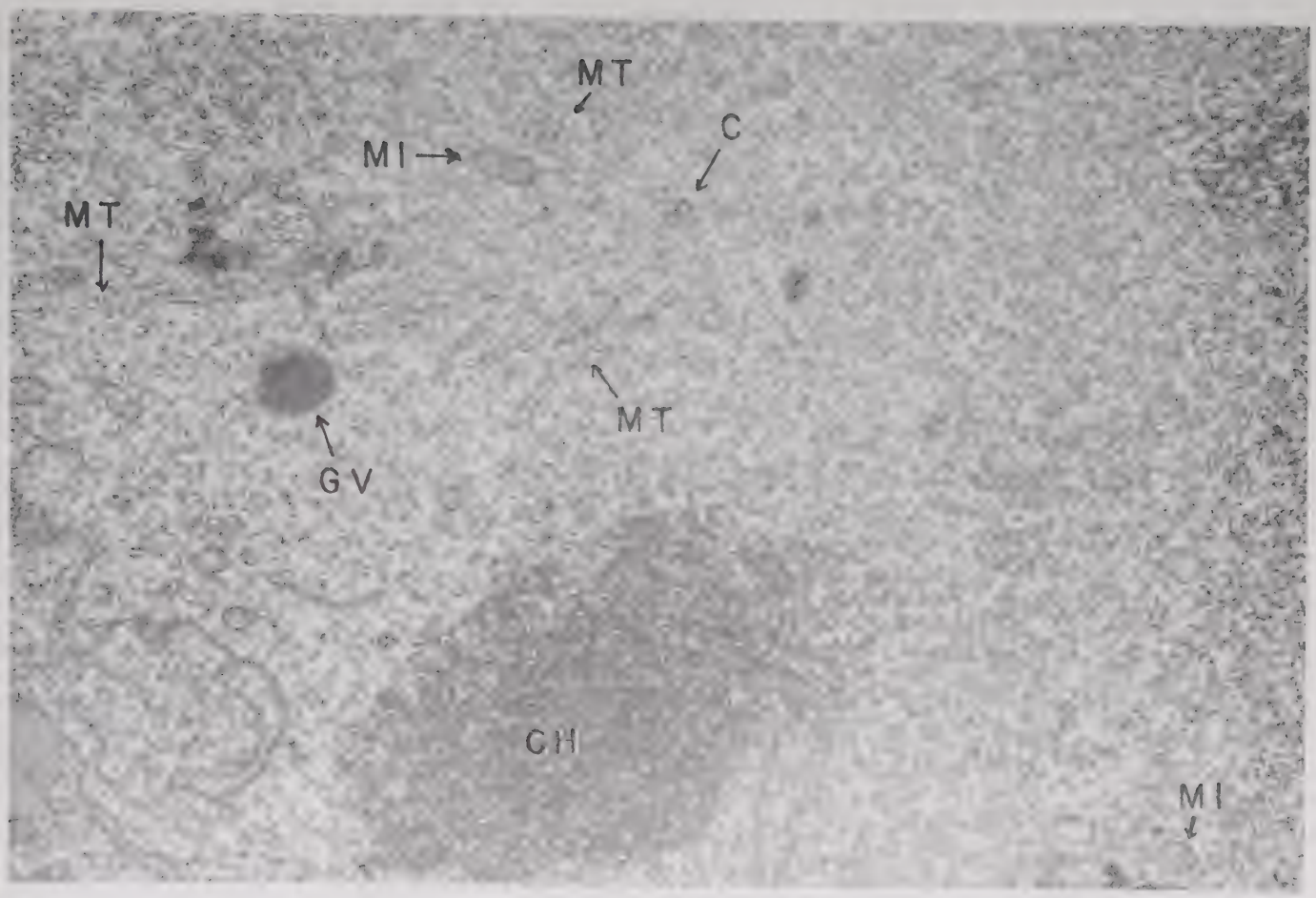
B : Détail d'un lambeau d'enveloppe nucléaire. Les pores nucléaires sont toujours visibles. x 40.000.

C : Détail des centrioles. x 100.000.

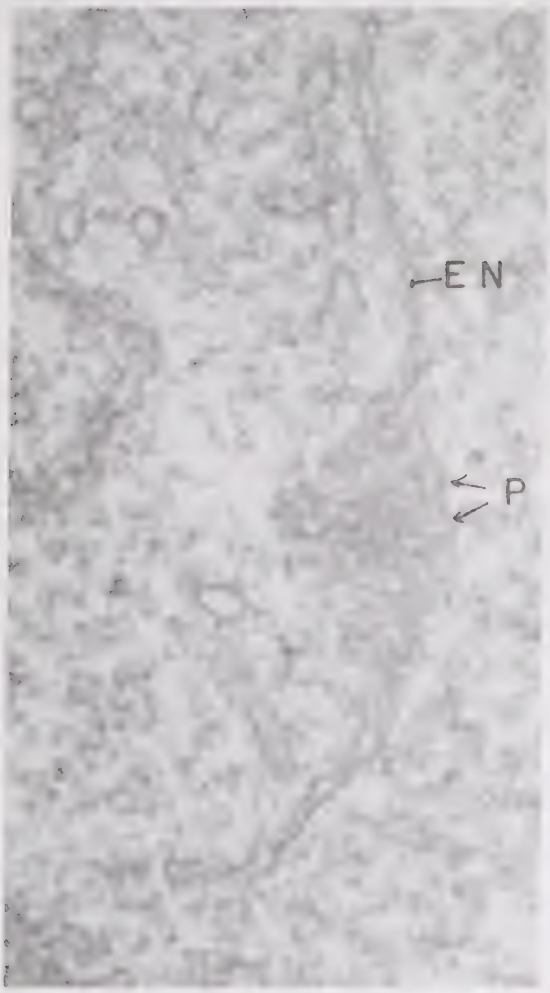
D : Stade plus avancé, montrant l'achèvement de la condensation des chromosomes et leur association avec des fragments de réticulum endoplasmique; x 20.000.

Ch : chromosome; C : centriole; MT : microtubules; MI : mitochondries; GV : globule vitellin; EN : enveloppe nucléaire; P : pores nucléaires; RE : réticulum endoplasmique.

A



B



C

D

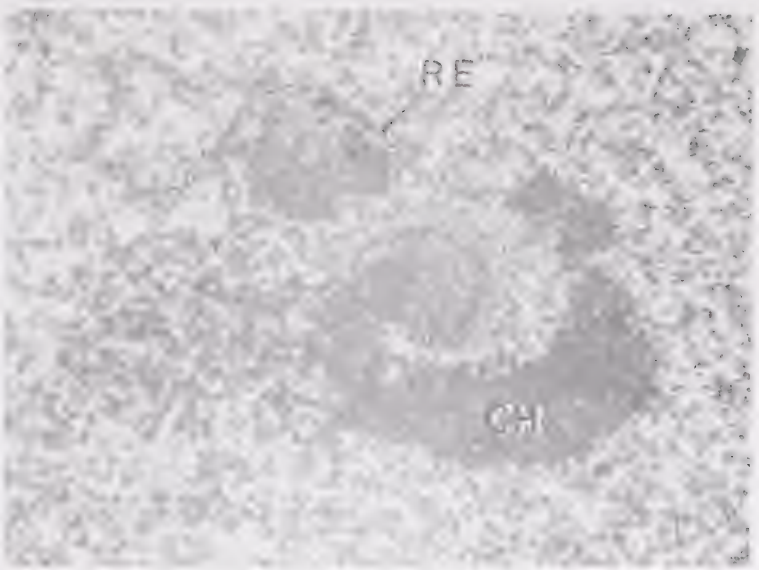


PLANCHE IX

Par contre, on n'observe pas de réduction notable du nombre de pores nucléaires alors que c'est le cas chez le chaetoptère (MERRIAM, 1961) ou chez l'Arénicole (MEIJER, 1979_a). Les microtubules ne sont pas spécialement perpendiculaires à l'enveloppe nucléaire au moment de sa rupture contrairement aux vertébrés (MASUI, 1979) et les asters contiennent des centrioles normaux comme chez l'Arénicole (MEIJER, 1979_a) alors qu'on n'en trouve pas chez les vertébrés (SZOLLOSI *et al.* 1972). Enfin, il ne semble pas qu'on ait observé chez d'autres espèces la présence de réticulum endoplasmique autour des chromosomes métaphasiques.

D'autre part, le blocage en métaphase I ne semble lié à aucune particularité ultrastructurale. Les ovocytes amenés en métaphase I par fécondation, qui émettront ensuite leurs globules polaires, ne présentent en effet aucune différence avec les ovocytes amenés en métaphase I par addition de sucs digestifs qui eux n'évolueront plus. La difficulté à fixer les microtubules des ovocytes maturés avait laissé supposer dans un premier temps que les microtubules étaient particulièrement labiles dans les ovocytes bloqués. Cependant les ovocytes fécondés fixés de la même manière ne montraient pas de microtubules non plus, et avec le fixateur de ASNES *et al.* les microtubules étaient observables dans les deux cas. De même la présence de réticulum autour des chromosomes métaphasiques s'observe dans les deux cas, quelque soit le fixateur.

LEGENDE DE LA PLANCHE IX

Observation en microscopie électronique d'ovocytes en promataphase (A) et en métaphase I (B,C,D). Fixation en 1 temps.

A : ovocyte traité depuis 15 min par des sucs digestifs. Des chromosomes sont dispersés autour d'un aster dont on distingue les centrioles. x 7.500.

B : coupe longitudinale d'un demi-fuseau métaphasique dans un ovocyte traité depuis 20 min par des sucs digestifs. Les chromosomes sont regroupés à l'équateur du fuseau. On distingue un centriole à l'apex du fuseau. x 9.200.

C : chromosome d'un ovocyte en métaphase I, traité depuis 20 min par des sucs digestifs. Le chromosome est entouré de réticulum endoplasmique. x 20.000.

D : chromosome d'un ovocyte en métaphase I, 20 min après fécondation en propahse. Le chromosome est également entouré de réticulum endoplasmique. x 20.000.

C : centriole; Ch : chromosomes; MT : microtubules; RE : réticulum endoplasmique.

Fécondation et achèvement de la méiose

Ainsi que l'a signalé D.P. WILSON (1968) les ovocytes de *Sabellaria* sont fécondables dès la prophase I. Il ne semble pas qu'il s'agisse là d'un artifice expérimental comme chez l'étoile de mer (CAYER *et al.* 1975) et *Pectinaria* (HYLANDER *et al.*1981) où la fécondation en prophase ne réinitie pas la méiose. Chez *Sabellaria* en effet, la fécondation d'ovocytes en prophase par des spermatozoïdes lavés de toute contamination protéasique déclenche la réinitiation de la méiose (Planche X, A) et donne des larves normales. Néanmoins, ainsi que l'avaient décrit les premiers auteurs (FAURE-FREMIET, 1924) l'ovocyte est aussi fécondable en métaphase I (Planche X, B), malgré le décollement de la membrane vitelline, car il y a formation d'un cône de fécondation qui vient toucher la membrane vitelline à l'endroit où se trouve le spermatozoïde (Planche X, C).

LEGENDE DE LA PLANCHE X

Observation en microscopie optique de la fécondation et de l'achèvement de la méiose.

A : ovocyte fécondé en prophase. La vésicule germinative vient de se rompre et on distingue le noyau spermatique partiellement décondensé. Feulgen *in toto;* contraste de phase; x 700.

B : ovocyte fécondé en métaphase I après traitement avec des sucs digestifs. On distingue le fuseau métaphasique et le noyau spermatique condensé. Feulgen *in toto;* contraste de phase; x 700.

C : fécondation d'un ovocyte en métaphase I. On distingue le spermatozoïde accolé au cône de fécondation. *In vivo;* x 800.

D : ovocyte après l'émission du premier globule polaire. Les dyades restent condensées ainsi que le noyau spermatique. Carmin acétique; x 700.

E : ovocyte en télophase II. Le deuxième globule polaire vient de s'isoler, les chromosomes restants et le noyau spermatique ne sont pas encore décondensés. Carmin acétique; x 700.

F : zygote au stade pronuclei. Les pronuclei mâle et femelle sont bien visibles mais ne sont pas fusionnés. Carmin acétique; x 700.

Ch : chromosomes; NS : noyau spermatique; FM : fuseau métaphasique; Spz : spermatozoïde; CF : cône de fécondation; gp_1 : premier globule polaire; Dy : dyades; gp_2 : deuxième globule polaire; PN : pronuclei.

PLANCHE X

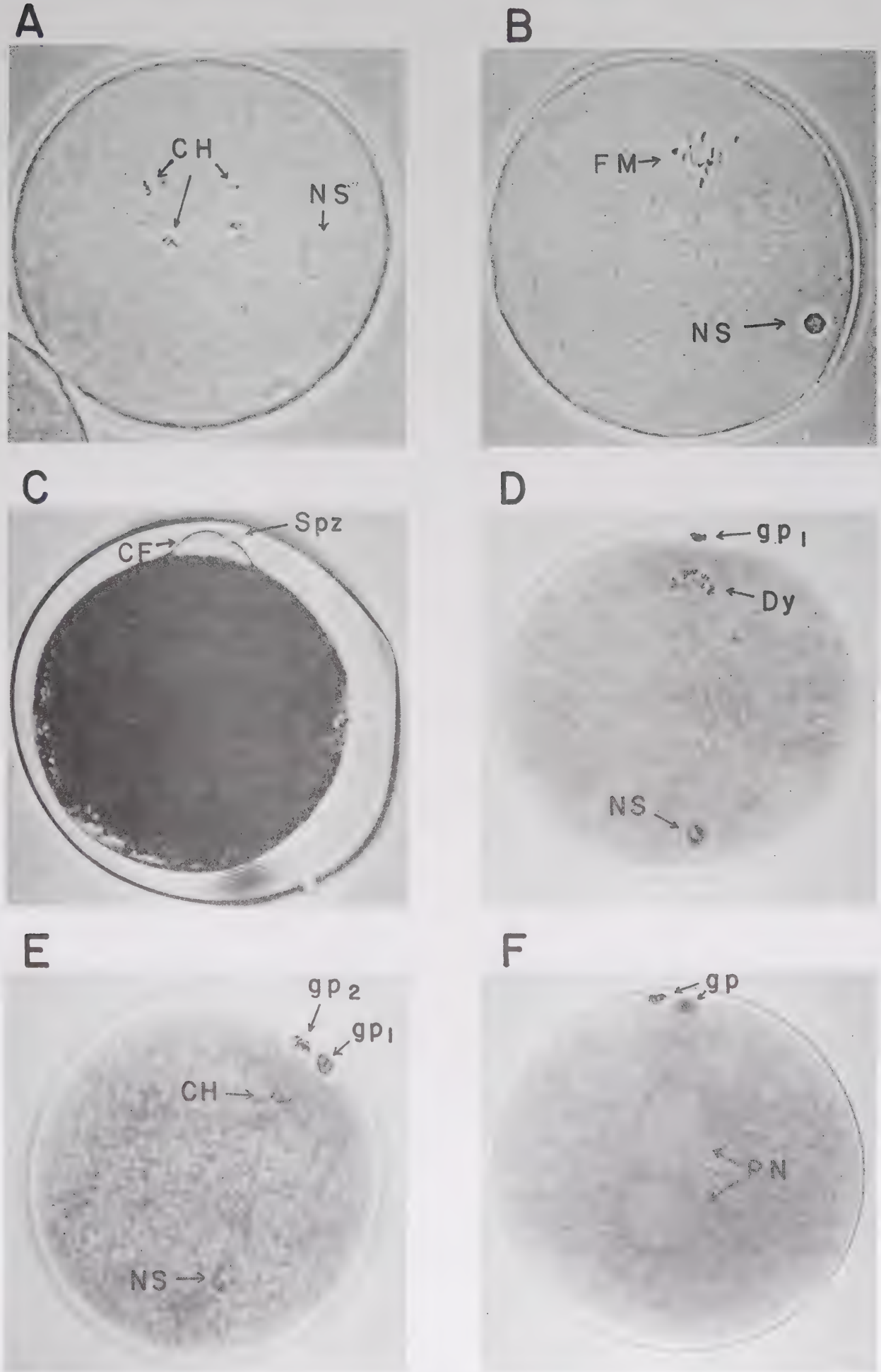
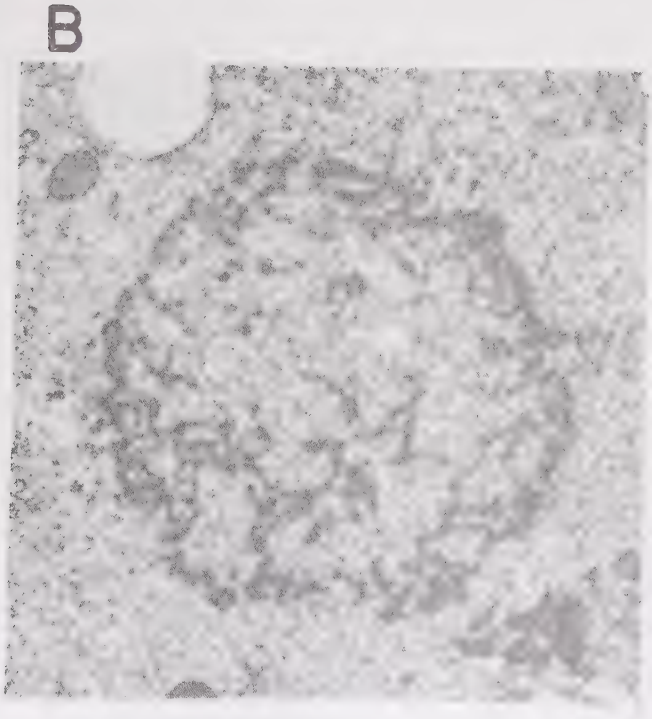
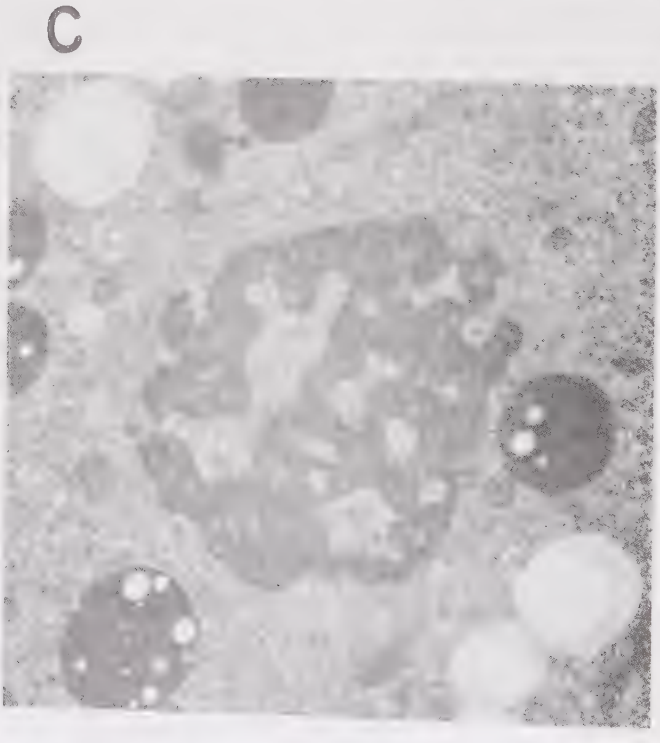


PLANCHE XI





Dans les deux cas, la métaphase I est suivie de l'émission du premier globule polaire environ 20 min plus tard. Les dyades restant dans l'ovocyte ne se décondensent pas tandis que le fuseau de 2ème division se met en place (Planche X, D). L'émission du 2ème globule polaire a lieu environ 15 min après celle du premier (Planche X, E). Jusqu'à la télophase II, le noyau spermatique reste visible dans le cytoplasme de l'ovocyte puis il se décondense en même temps que les chromosomes restants de l'ovocyte pour former les pronuclei ♂ et ♀ (Planche X, F).

L'ultrastructure du spermatozoïde (Planche XI, A) correspond bien au schéma donné par PASTEELS (1965). A la base du noyau spermatique compact se trouve la pièce intermédiaire avec ses quatre volumineuses mitochondries, le centriole proximal et le centriole distal intégré dans le corpuscule basal du flagelle.

A l'apex se trouve l'acrosome composé d'un granule acrosomial en cloche dont le contenu a un aspect différent selon les zones et du matériel sous-acrosomial fibreux localisé dans la cavité du granule acrosomial. Le granule acrosomial contient vraisemblablement les lysines nécessaires à la traversée de la membrane vitelline tandis que le matériel sous acrosomial doit former le filament acrosomien qui prend contact avec la membrane cytoplasmique de l'ovocyte.

A l'intérieur du cytoplasme de l'ovocyte, le noyau spermatique perd sa membrane nucléaire et se décondense plus ou moins (Planche XI, B et C). Il ne semble pas y avoir de relation stricte entre l'état de condensation du noyau spermatique et les stades méiotiques de l'ovocyte jusqu'à la télophase II.

LEGENDE DE LA PLANCHE XI

Observation en microscopie électronique des spermatozoïdes (A) et du noyau spermatique après fécondation (B,C). Fixation en 2 temps.

A : spermatozoïdes coupés sous divers angles. On distingue dans l'acrosome, le granule acrosomial (GA) entourant le matériel sous acrosomien (MSA). La chromatine du noyau (N) est très compacte. La pièce intermédiaire contient les mitochondries (MI) un centriole proximal (CP) et le corpuscule basal (CB) du flagelle (F).

B, C : détail du noyau spermatique dans des ovocytes au stade métaphase I. Les deux ovocytes proviennent de la même préparation; ils ont été fécondés en prophase et fixés au stade métaphase I. Dans les deux cas, la membrane nucléaire a disparu mais la chromatine est nettement plus décondensée en B qu'en C. x 13.000.

L'évolution des ovocytes n'est pas très synchrone même pour ceux d'une même femelle. La figure 1 (A,B,C) montre l'évolution cytologique de lots d'ovocytes dont la méiose est réinitiée selon diverses modalités. La durée des stades est sensiblement la même quelle que soit la méthode utilisée; toutefois la réinitiation de la méiose par fécondation est toujours un peu plus lente car tous les ovocytes ne sont pas fécondés immédiatement après l'addition du sperme d'où une asynchronie accrue pour la rupture de la vésicule germinative ou l'émission du premier globule polaire. La durée moyenne des stades est indiquée en D de la figure 1.

Légende de la Figure 1 :

Etude cinétique de la méiose :

Dans chaque expérience, la méiose est réinitiée dans un lot d'ovocyte par addition de sucs digestifs ou de spermatozoïdes. A divers temps des aliquotes sont fixées au mélange de Carnoy et colorées au carmin acétique. L'observation au microscope permet ensuite de déterminer dans chaque prélèvement le pourcentage d'ovocytes ayant atteint ou dépassé un stade donné. Les traits verticaux indiquent l'intervalle de confiance à 95 chances sur 100.

A - Déclenchement de la maturation par addition de sucs digestifs à des ovocytes en prophase.

GVB, vésicule germinative rompue;

MI, métaphase I

B - Achèvement de la méiose par addition de spermatozoïdes à des ovocytes bloqués en métaphase I.

gp_1, premier globule polaire émis;

gp_2, deuxième globule polaire émis;

S_1, pro-métaphase de première segmentation.

C - Réinitiation de la méiose par addition de spermatozoïdes à des ovocytes bloqués en prophase I.

GVB, vésicule germinative rompue;

MI, métaphase I;

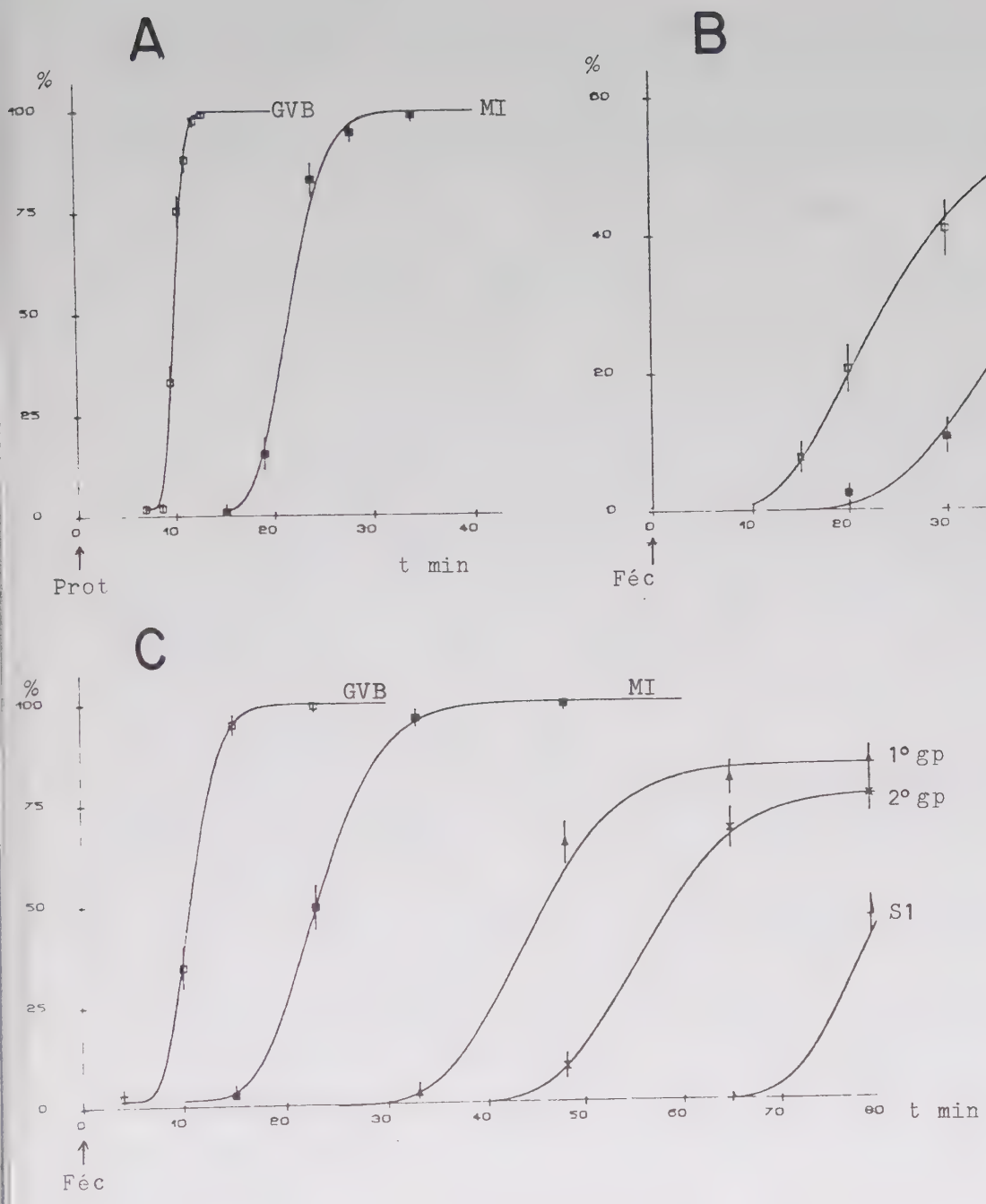
gp_1, premier globule polaire émis;

gp_2, deuxième globule polaire émis;

S_1, prométaphase de première segmentation.

D - Chronologie du déroulement de la méiose.

FIGURE 1.



D

0	
10	Rupture de la VG
20	Métaphase I
30	
40	Anaphase I Télophase I
50	Métaphase II
60	Anaphase II Télophase II
70	Gonflement des pronucléi
80	
t min	Pro-métaphase 1° segment.

2ème PARTIE

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEASES DECLENCHANT LA MATURATION

Lors des études de D.E.A. (PEAUCELLIER, 1971) et thèse de 3ème cycle (PEAUCELLIER, 1973), il avait été observé que dans les pontes présentant un fort pourcentage d'ovocytes bloqués en prophase I, il était cependant possible de déclencher expérimentalement la maturation par addition de divers extraits. Les extraits de sperme filtré ou tué par congélation étaient actifs, ce qui suggérait *a priori* l'existence d'un facteur spermatique soluble. La maturation était également obtenue par addition d'une région antérieure d'adulte sectionnée, ce qui pouvait laisser penser à l'existence d'un facteur neuroendocrine comme chez l'arénicole (HOWIE, 1966). Cependant, il était régulièrement constaté que l'eau des pontes contenant des ovocytes bloqués était toujours limpide, alors que lorsqu'elle présentait une teinte jaune, tous les ovocytes maturaient. Il était facile d'observer que cette couleur jaune provenait du tube digestif de la femelle, soit par défécation pendant la ponte, soit par suite d'une blessure lors de l'extraction du tube. En effet, chez *Sabellaria*, comme chez d'autres polychètes tubicoles, le tube digestif, rectiligne et volumineux, n'est pas protégé par des masses musculaires et affleure dorsalement sous le mince épiderme, il est donc facilement lésé lors de l'extraction du tube. Le fin post-abdomen de l'animal qui permet l'expulsion des fèces à l'extérieur du tube est lui aussi très fragile et lorsqu'il est endommagé, une partie du contenu du tube digestif est expulsé. Il était d'autre part facilement vérifié que l'addition d'un peu de suc digestif prélevé par ponction suffisait à déclencher la maturation, même s'il provenait d'un mâle. Ce résultat pouvait aussi expliquer l'action des autres extraits car tous étaient contaminés par des sucs digestifs. C'est donc ce facteur déclenchant des sucs digestifs qui devait être étudié en premier. Une étude rapide de quelques enzymes digestifs et de leurs inhibiteurs qui sera reprise plus en détail dans la troisième partie, devait montrer rapidement que l'activité des sucs digestifs était due uniquement à des protéases puisqu'elle était totalement inhibée par l'addition de l'inhibiteur de la trypsine extrait des graines de soja (SBTI). Ce résultat était engageant car les protéases sont des enzymes bien étudiées pour lesquelles on dispose de nombreuses techniques de purification et de dosage. On pouvait ainsi espérer qu'une fois la (ou les)

protéase purifiée, l'étude de ses caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques fournirait des indications sur son mode d'action dans la réinitiation de la méiose.

Matériel et méthodes

- Obtention des sucs digestifs bruts

Le contenu du tube digestif est prélevé par ponction dans la moitié postérieure à l'aide d'une pipette de verre. Les animaux extraits de leur tube sont laissés auparavant 24 h. à 48 h. dans un récipient propre avec de l'eau de mer courante, leur tube digestif a ainsi le temps de se vider du sable qu'il contient usuellement et qui gêne le prélèvement. On peut ainsi récupérer en moyenne 5 µl de liquide digestif par animal. Ce liquide est généralement dilué 5 fois avec de l'eau de mer tamponnée (cf 1ère partie) et gardé au congélateur à - 20°C jusqu'à un an sans perte notable d'activité.

- Chromatographie sur colonne

Les filtrations sur gel ont été effectuées avec des dextrans réticulés (Sephadex G 100, Pharmacia) et un gel mixte d'acrylamide-agarose (Ultrogel ACA 54, IBF).

Pour la chromatographie d'affinité on a utilisé de la benzamidine couplée à la cellulose (don gracieux des Ets Merck), du SBTI couplé au Sepharose 4 B, soit préparé au laboratoire par couplage au bromure de cyanogène de 0.5 g de SBTI (Worthington) à 11 ml de Sepharose 4 B (Pharmacia) selon la technique de CHAUVET & ACHER (1973), soit acheté tout prêt (Miles). Des essais ont également été faits avec de l'ester méthylique du D-Tryptophane (DTME) couplé au Sepharose 4 B (Miles).

Les chromatographies échangeuses d'ions ont été faites avec du CM-Sepharose CL6B et du DEAE-Sepharose CL6B fabriqués par Pharmacia.

Les changements de tampons ont généralement été faits sur colonne de Sephadex G 25 (Pharmacia) et les concentrations par ultrafiltration sur membrane Amicon UM2.

- Tests d'activité enzymatique

Pour les tests d'activité protéolytique non spécifique, la digestion du

Hide powder azure (Calbiochem et Sigma) a été utilisé. Le Hide powder azure (HPA) a été utilisé soit selon la technique originale (RINDERKNECHT *et al.*, 1968) : 20 mg de HPA suspendu dans 5 ml de tampon tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl (Tris-HCl) 50 mM/l, KCl 0.1 M/l, pH 8.0, additionné d'enzyme puis incubé 30 min à 37°C et mesure de la DO du filtrat à 595 nm, soit selon une technique légèrement modifiée où l'hydrolyse a été faite en eau de mer tamponnée à 25°C pendant 5 h. Chaque solution enzymatique a été testée à diverses concentrations et la courbe des densités optiques en fonction de la concentration en enzyme a été tracée. Les unités d'activité ont été définies selon la méthode de KUNITZ à partir de la tangente à l'origine de la courbe. Toutefois comme la teneur en colorant diffère d'un lot à l'autre, on à défini l'unité d'activité en fonction des mg de HPA solubilisés et non de la D.O. obtenue. Ainsi une unité HPA correspond à la quantité d'enzyme qui dans les conditions de l'essai hydrolyse 1 mg de HPA par ml et par min. La D.O. correspondant à l'hydrolyse d'1 mg de HPA est donnée par traitement d'un échantillon de chaque lot avec un excès d'enzyme. Comme il est souvent difficile de déterminer la tangente à l'origine avec une précision satisfaisante sans faire un trop grand nombre d'essais, il s'est avéré utile de tenir compte des points situés sur le début de l'inflexion de la courbe. Cette zone peut être considérée avec une assez bonne approximation comme résultant d'une réaction du 1er ordre (MIHALYI, 1972). Le logarithme de la fraction de substrat hydrolysé est dans cette hypothèse proportionnel à la concentration en enzyme et le coefficient de proportionalité permet de calculer la tangente à l'origine de la courbe initiale ainsi que d'évaluer la précision de la mesure.

L'activité estérolytique envers l'ester méthylique de la p-tosyl-arginine (TAME) (Sigma et Koch-light) et de l'ester éthylique de la N-benzoyl-L-tyrosine (BTEE) (Sigma) a été déterminée spectrophotométriquement et celle envers l'ester éthylique de la N-acetyl-tyrosine (ATEE) (Sigma) potentiométriquement. Les méthodes et les définitions des unités sont celles décrites par WALSH& WILCOX (1970). La mesure spectrofluorimétrique de l'hydrolyse du N-glutaryl-glycyl-L-Phe-β-naphthylamide (GGPNA) (Bachem), très sensible, a été aussi utilisée selon la technique de RINDERKNECHT & FLEMING (1975).

La titration des sites actifs a d'abord été faite spectrophotométriquement par la technique de ERLANGER & EDEL (1964) avec le 2-nitro-4-carboxyphenyl-N-

N-diphenylcarbamate (NCDC) (Sigma)*. Par la suite, les dosages ont été faits en spectrofluorimétrie avec le methylumbelliferyl p-guanidinobenzoate (MUGB) (Sigma) selon la technique de COLEMAN *et al.* (1976) et le chlorure de 4-methyl-umbelliferyl p- (NNN-trimethylammonium) cinnamate (MUTMAC) (Sigma) selon la méthode de JAMESON *et al.* (1973).

- Techniques électrophorétiques

Deux techniques d'électrophorèse bidirectionnelle ont été utilisées pour tester la pureté des fractions obtenues par chromatographie. La première est celle décrite par URIEL (1966) sur plaque Indubiose (acrylamide 5%, agarose 0.8%) (Sebia) dans une chambre d'électrophorèse horizontale (Desaga) avec pour seule modification l'addition de $CaCl_2$ 10 mM/l dans le tampon du gel et d'électrodes. Des logettes découpées à l'emporte pièce vers le milieu du gel sont remplies de Sephadex G 200 (Pharmacia) imbibé d'échantillon. Après 3 h d'électrophorèse sous une tension de 300 volts, le gel est coloré au bleu de Coomassie selon la technique d'URIEL. La deuxième technique est dérivée du système à tampon discontinu de RACUSEN (1967). Les gels de séparation à 7.5% d'acrylamide et le gel contenant l'échantillon (2.4% d'acrylamide) sont coulés successivement dans des tubes de 12 cm de long pour 0.5 cm de diamètre interne. Le gel cathodique contenant 100 mM/l de Taurine et 80 mM/l de KOH est coulé d'abord sur une hauteur de 5 cm, après polymérisation le gel anodique contenant 300 mM/l d'imidazole et 60 mM/l d'HCl est coulé par-dessus et avant qu'il polymérise, 55 µl de gel d'échantillon contenant 20 mM de Tris-HCl pH 8 et 30% de glycérine sont coulés par dessous. Après polymérisation, les gels sont soumis à 2 h. d'électrophorèse sous une tension de 100 v. dans une cuve Pharmacia. Les fronts de migration sont repérés par le bleu de bromophénol (du côté anodique) et la safranine (du côté cathodique) ajoutés dans le gel d'échantillon et marqués à l'encre de chine. Les gels sont colorés au bleu de Coomassie G 250 0,4°/₀₀ (Serva) dans l'acide perchlorique (5%) (REISNER *et al.* 1975) ou traités à l'acide périodique-Schiff (KAPITANY *et al.* 1973) pour détecter la présence d'éventuels résidus glucidiques, la glycoprotéine de référence étant de l'ovalbumine purifiée (Sigma, type VII).

Les mesures de poids moléculaire ont été faites par électrophorèse en

---

* et avec le p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl (P-NPGB) (Merck) selon la technique de CHASE *et al.* (1970).

présence de sodium-dodécyl-sulfate (SDS) selon la technique de LAEMMLI (1970) avec un gel de séparation à 15% d'acrylamide. La courbe étalon a été établie à l'aide de protéines purifiées de poids moléculaire connu : α-chymotrypsine, trypsine, albumine sérique de boeuf, myoglobine de cheval, lysozyme et albumine d'oeuf de poule, SBTI (Sigma). Des mélanges de polymères de protéines purifiées ont également été utilisés : hémoglobine de boeuf (Sigma) et lysozyme (BDH).

Les points isoélectriques ont été déterminés sur ampholine-PAG-plate pH 3.5-9.5 (LKB) selon la notice du fabricant.

Tests biologiques :

L'activité des fractions pour la réinitiation de la méiose a été testée sur des ovocytes bloqués en prophase I, préparés comme décrit dans la première partie. Les ovocytes sont incubés avec diverses dilutions d'enzyme et fixés au bout d'1 h. par addition de formol. Les pourcentages de maturation pour chaque dilution sont déterminés ensuite au microscope. Par analogie avec les tests pharmacologiques, l'unité d'activité biologique est définie comme la quantité d'enzyme qui, dissoute dans 1 ml d'eau de mer contenant les ovocytes, déclenche 50% de maturation. Une courbe de calibration établie avec une protéase, d'activité estérolytique connue, permet de standardiser les mesures d'activité biologique faites avec des lots d'ovocytes différents.

- *Etude de l'influence des ions et des groupements sulfhydryles*

Les protéases sont incubées 30 min à 25° dans un tampon Tris 50 mM/l pH 8 contenant soit 10 mM/l de $CaCl_2$, avec ou sans P -chloromercuribenzoate (PCMB) (Sigma) (0.5 mM/l), soit 1 mM/l de $CaCl_2$, soit pas de $CaCl_2$, avec ou sans EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) (Merck) (10 mM/l). L'activité estérolytique résiduelle de 100 µl du milieu d'incubation est alors déterminée avec 3 ml soit de TAME (T), soit de BTEE (C_4, C_3, C_2, C_1, CT_1, CT_2, CT_3). Les solutions de substrat contiennent les mêmes concentrations de Ca et de PCMB que les solutions d'incubation, de plus celles destinées à tester l'incubation en CaO contiennent également 0.32 mM/l d'EDTA.

- *Inhibiteurs irréversibles*

Les inhibiteurs utilisés sont le PMSF (phénylméthanesulfonylfluorure), le

le TLCK (N-α-tosyl-L-lysine-chloromethyl-cétone), le TPCK (N-α-tosyl phenylalanine-chlorométhyl-cétone) et le ZPCK (N-α-benzyloxycarboxyphenyl-chlorométhyl-cétone), tous de chez Sigma. Les solutions mères (0,5 mM/l) sont préparées dans du diméthylsulfoxide (DMSO). Les protéases sont incubées 10 min à 25°C avec 10% de DMSO contenant ou non l'inhibiteur (50 µM/l final), 0,1 M/l de Tris pH 7 et 10 mM/l de $CaCl_2$. L'activité résiduelle de 0.1 ml du milieu d'incubation est testée avec 3 ml de GGPNA. Les constantes d'inhibition sont calculées d'après les mesures d'activité estérolytique après divers temps d'incubation avec différentes concentrations d'inhibiteur selon la formule :

$$k_2 = \frac{\text{Log } \frac{Vi}{Vo}}{I \times t}$$

où Vi et Vo sont les vitesses initiales d'hydrolyse du substrat après incubation avec (Vi) ou sans inhibiteur (Vo), I la concentration d'inhibiteur (M/l), t le temps d'incubation (min).

- *Constantes cinétiques*

Les constantes déterminées sont les constantes "apparentes" d'une réaction à un seul intermédiaire (alors qu'il y en a certainement 2) obéissant aux équations de MICHAELIS-MENTEN :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{kcat} E + P, \text{ avec } K_M = \frac{k_2 + kcat}{k_1}$$

et $V_i = \frac{kcat\ (E)\ (S)}{K_M + (S)}$ où E désigne l'enzyme, S le substrat, P le produit, Vi la vitesse initiale de réaction (CUNNINGHAM, 1965). Les K_M et V_{max} sont calculées par la méthode de WILKINSON (1961) avec une calculatrice HP 41 (Hewlett-Packard).

- *Spécificité de substrat*

L'hydrolyse d'esters du p-nitrophénol (o-Np) de divers acides aminés N-substitués avec un groupement carbobenzyloxyle (Z) par les protéases T, C_4 et CT_2 est suivie spectrophotométriquement à 400 nm. Chaque milieu d'incubation contient 20 µM/l de substrat et 10% de DMSO dans un tampon Tris 50 mM/l pH 8, $CaCl_2$ 10 mM/l. La différence de libération de p-nitrophénol à 25°C entre la

cuve avec enzyme et la cuve de référence est enregistrée en continu.

Les substrats testés sont le z-glycine-ONp (z-Gly-ONp), le z-L-Valine-ONp (z-L-Val-ONp), le z-L-tyrosine ONp (z-L-Tyr-ONp), le z-L-proline-ONp (z-L-Pro-ONp) de Sigma, le z-L-alanine-ONp (z-L-Ala-ONp) et le z-L-lysine-ONp (z-L-Lys-ONp) de Bachem. Les solutions mères (2 mM/l) sont préparées dans le DMSO.

Deux substrats de carboxypeptidases ont été essayés : l'hippuryl-L-argine et l'hippuryl-L-phénylalanine (Bachem). Ils ont été dissous (1 mM/l) dans un tampon Tris 50 mM/l, $CaCl_2$ 10 mM/l, pH 8, et l'hydrolyse a été suivie spectrophotométriquement à 254 nm.

Trois substrats d'aminopeptidases ont également été testés : la L-leucine-β-naphthylamide (Bachem), la L-Arginine-β-naphthylamide et la L-tyrosine-β-naphthylamide (Sigma). L'hydrolyse a été suivie au spectrofluorimètre.

- Inhibiteurs d'origine microbienne

La chymostatine, l'antipaine (Sigma) et la leupeptine (Bachem) sont dissoutes (1%) dans le DMSO. Le substrat est additionné de 10% de DMSO contenant ou non l'inhibiteur, puis d'enzyme (ou d'eau distillée pour les témoins). Pour la protéase T, l'hydrolyse enzymatique du TAME est mesurée au spectrophotomètre. Pour les autres protéases, l'hydrolyse du GGPNA après 1 h d'incubation à 37°C est mesurée au spectrofluorimètre.

- Précision des mesures

Pour la comparaison des propriétés physico-chimiques et enzymatiques des protéases isolées, il a paru utile d'évaluer la précision de certaines mesures. Dans la plupart des cas, il n'a pas été possible d'effectuer un nombre suffisant de mesures totalement indépendantes pour déterminer les intervalles de confiance ayant une réelle signification statistique. Il a paru néanmoins utile d'indiquer la précision des résultats établie d'après un petit nombre de mesures non totalement indépendantes. Ces estimations ne fournissent donc que l'incertitude minimale connue et si elles ne permettent pas d'affirmer qu'une différence est significative, elles mettent en évidence celles qui ne peuvent l'être en aucun cas.

Fractionnement par filtration sur gel

Lorsque un échantillon de sucs digestifs filtrés sur millipore est appliqué sur une colonne de Sephadex G 100, toute l'activité protéolytique et biologique se retrouve dans un seul pic, comme le montre la figure 2. L'activité protéasique a été ici testée avec un substrat de la trypsine (TAME) et un substrat de l'α-chymotrypsine (BTEE) mais il a été vérifié dans une autre expérience avec un substrat non spécifique (HPA) qu'il n'y a pas d'activité protéolytique ailleurs que dans le pic d'activité biologique. La position de ce pic correspond à un poids moléculaire de 15.000 à 22.000 daltons. Toutefois, les profils d'élution des diverses activités diffèrent suffisamment pour exclure qu'il n'y ait qu'une seule protéase dans ce pic.

Lorsque les fractions actives d'une chromatographie sur Sephadex G 100 sont regroupées, concentrées par ultrafiltration et appliquées sur une colonne de gel mixte acrylamide-agarose, l'activité protéolytique est éluée en trois pics (fig. 3). Le premier correspond à une activité de type trypsique avec une activité estérolytique forte vis-à-vis du TAME et très faible vis-à-vis du BTEE; l'activité biologique pour cette fraction (qui sera appelée T) est très faible et elle est éluée comme une protéine de poids moléculaire 30.000 daltons. Le pic suivant (fraction C) correspond à une activité estérolytique de type chymotrypsique, puisque le BTEE est hydrolysé spécifiquement et à un poids moléculaire de 20.000 daltons. Son activité biologique est nettement plus forte. La troisième fraction (CT) est éluée comme une protéine de 10.000 daltons de poids moléculaire. C'est elle qui présente la plus forte activité biologique et elle hydrolyse à la fois le TAME et le BTEE, ce qui implique qu'elle correspond soit à un enzyme peu spécifique, soit au mélange d'un enzyme de type trypsique et d'un enzyme de type chymotrypsique. Dans les deux procédés l'activité estérolytique récupérée est toujours voisine de 90% de celle introduite. On note que les poids moléculaires trouvés sur Ultrogel pour les fractions T et CT sont très différents de ceux déduits de la chromatographie sur Sephadex G 100. D'ailleurs si on rechromatographie les fractions séparées sur Ultrogel sur une colonne de Sephadex G 75, elles sont éluées à nouveau dans des positions qui correspondent au pic initialement obtenu sur Sephadex G 100 : 23.000 daltons pour T, 20.000 pour C, 15.000 pour CT. Ceci montre que des facteurs autres que le poids moléculaire conditionnent le volume d'élution des protéases, surtout sur Ultrogel. Un tel comportement anormal a été également trouvé pour les protéases commerciales, bactériennes aussi bien que bovines. La nature de l'interaction avec le gel qui retarde l'élution n'a pas été clairement élucidée, mais les résidus lysines de l'enzyme jouent un rôle important

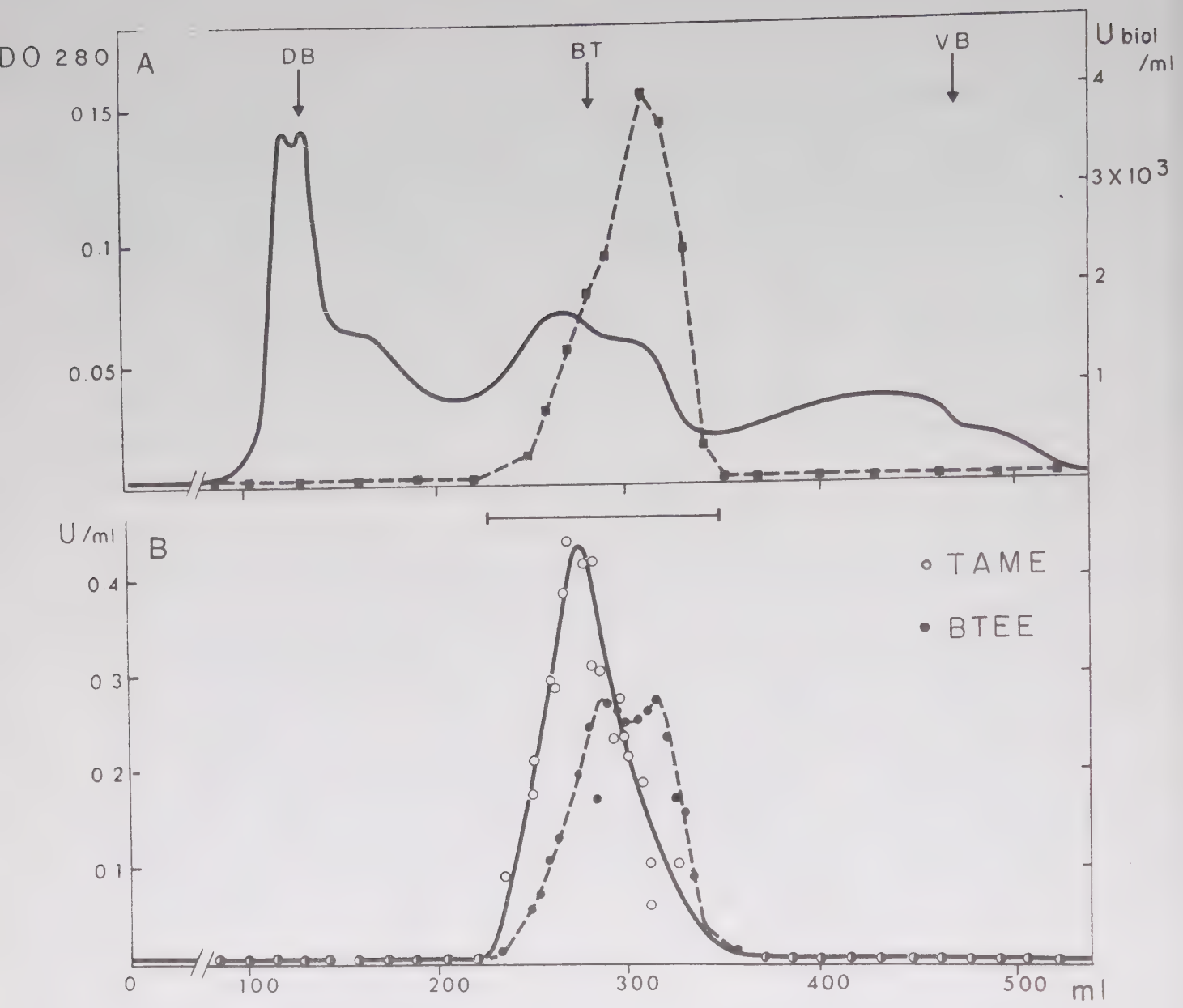


Fig. 2 - Filtration de sucs digestifs bruts sur Sephadex G 100.

50 µl de sucs digestifs dilués dans 1 ml de tampon d'élution (Tris 50 mM/l pH 8, KCl 0,1 M/l) sont appliqués sur une colonne de Sephadex G 100 (2.5 x 100 cm). La colonne est ensuite percolée à 27 ml/h avec le tampon d'élution. La densité optique à 280 nm de l'éluat est enregistrée en continu et des fractions de 5 ml sont recueillies.

A - Densité optique (———) et activité biologique (--■--) des éluats. Pour comparaison les volumes d'élution du bleu dextran (DB), de la trypsine de boeuf (BT) et de la vitamine B_{12} (VB) sur une colonne identique sont indiqués.

B - Activité estérolytique des éluats vis-à-vis du TAME (—o—) et du BTEE (--●--).

Le trait horizontal indique les fractions regroupées pour les purifications ultérieures.

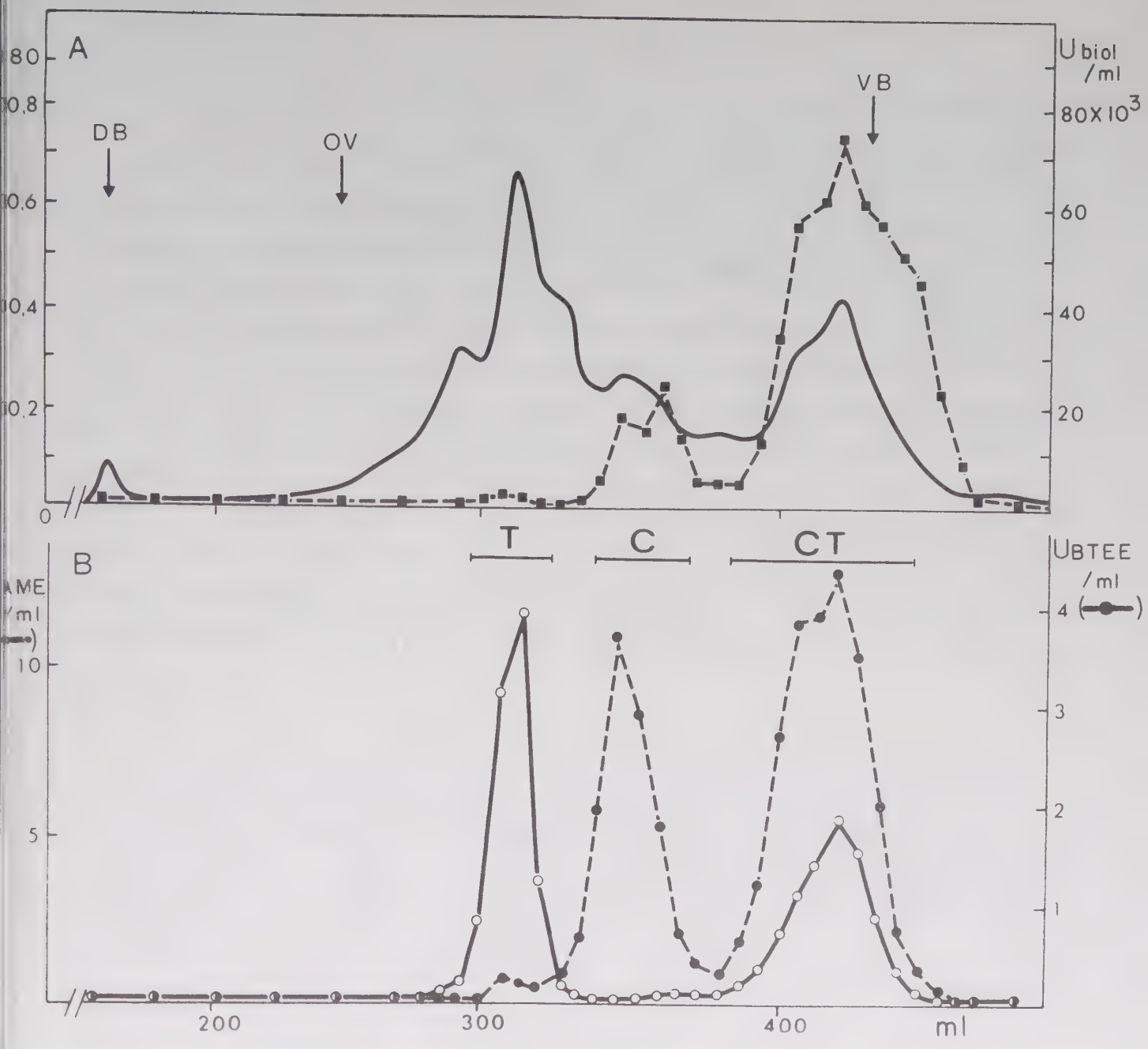


Fig. 3 - Filtration sur gel d'acrylamide-agarose des fractions actives obtenues sur Sephadex G 100.

2.5 ml de fraction active recueillie après filtration sur Sephadex G 100 et concentrée par ultrafiltration sont appliquées sur une colonne d'ultrogel ACA 54 (2.5 x 100 cm). La colonne est ensuite éluée à 30 ml/h avec du Tris 50 mM/l pH 8, KCl 0.1 M. La DO à 280 nm de l'éluat est enregistrée en continu et des fractions de 7 ml sont recueillies.

A - Densité optique (—) et activité biologique (--■--) des éluats. Pour comparaison, les volumes d'élution du bleu dextran (DB), de l'ovalbumine (OV) et de la vitamine B_{12} (VB) sur une colonne identique sont indiqués.

B - Activité estérolytique des éluats vis-à-vis du TAME (—o—) et du BTEE (--●--).

Les traits horizontaux indiquent les fractions qui ont été regroupées pour l'analyse ultérieure.

(voir Annexe 1 : PEAUCELLIER, 1976, Biochimie 58, 1273-1276).

Les trois fractions séparées sur Ultrogel apparaissent homogènes du point de vue enzymatique comme le montrent les cinétiques d'inhibition (fig. 4). Ainsi toutes trois sont inhibées par le PMSF, elles appartiennent donc à la catégorie des protéases ayant dans leur site actif un résidu sérine qui est sulfonylé par le PMSF (GOLD, 1965). Elles sont également sensibles à des inhibiteurs du groupe des chlorométhyl cétone qui alkylent un résidu histidine essentiel pour la catalyse et sont spécifiques soit de la trypsine (TLCK) (SHAW *et al.* 1970) soit de l'α-chymotrypsine (TPCK) (SHAW *et al.* 1971). Comme prévu d'après la spécificité de substrat, la fraction T, inactivée par le TLCK mais pas par le TPCK, est du type trypsine et la fraction C est du type chymotrypsine : inhibition par le TPCK mais pas par le TLCK. La différence de sensibilité au PMSF, 1.000 fois plus forte pour C que pour T, confirme ces analogies,

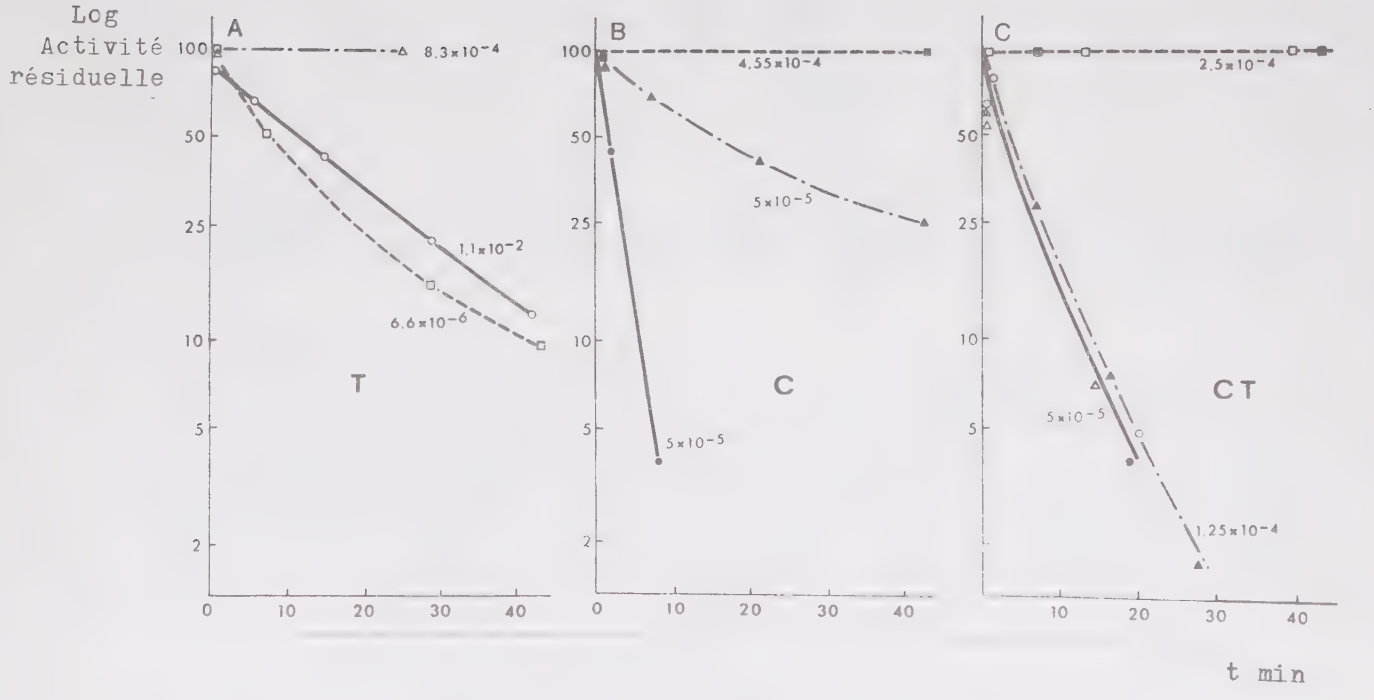


Fig. 4 - Courbes d'inactivation de l'activité estérolytique des fractions T, C et CT par des inhibiteurs spécifiques.

l'inhibiteur (PMSF ——, TLCK ---, TPCK -•-) est ajouté à la fraction enzymatique T (A), C (B) ou CT (C) diluée dans un tampon Tris 50 mM/l pH 8, $CaCl_2$ 10 mM/l. La concentration finale en inhibiteur (M/l) est indiquée au niveau de chaque courbe. Le mélange est incubé à 20°C et à divers temps, l'activité estérolytique vis-à-vis du TAME (symboles blancs) et du BTEE (symboles noirs) est déterminée.

car il est connu que la chymotrypsine est plus facilement inhibée que la trypsine (FAHRNEY *et al.* 1963). Dans la fraction CT on observe que les activités TAME et BTEE sont toujours inhibées au même degré, ce qui exclut la présence de deux enzymes différentes. Il s'agit donc d'une protéase de faible spécificité, plus proche toutefois de la chymotrypsine que de la trypsine car elle est inactivée par le TPCK mais pas par le TLCK et est très sensible au PMSF. De plus, l'assez bonne linéarité de ces courbes d'inactivation, correspondant à une cinétique du 1er ordre, indique que l'activité protéolytique de chaque fraction est due essentiellement à une seule enzyme ou à plusieurs isoenzymes ayant des constantes d'inhibition voisines.

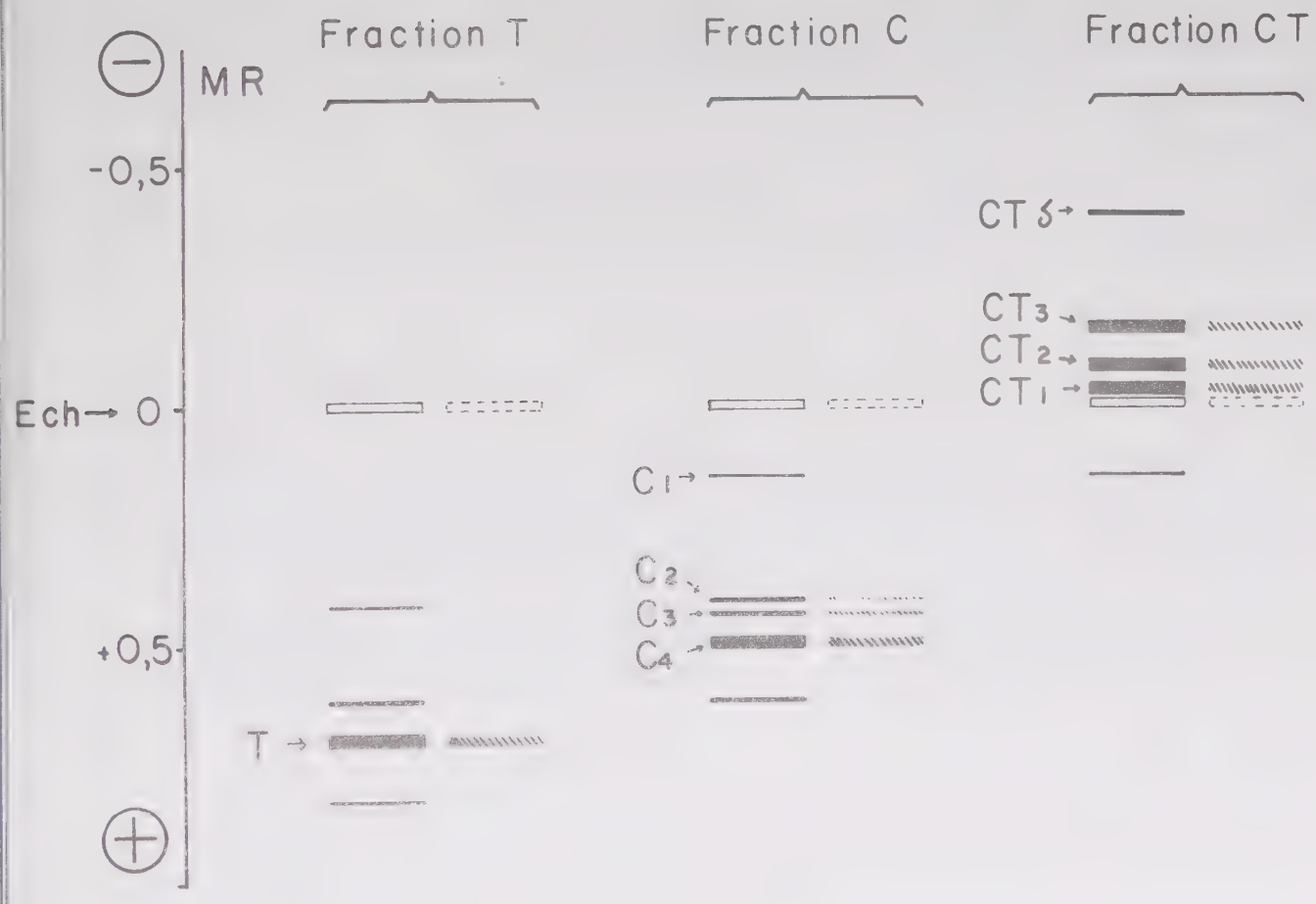


Fig. 5 - Electrophorèse sur gel d'acrylamide-agarose des fractions T, C et CT.

Les fractions T, C et CT sont appliquées au centre du gel et, après électrophorèse, une partie du gel est colorée au bleu de coomassie, l'autre est déposée sur un film de gélatine et incubée 1 h 30 dans une chambre humide à 37°C.

Les traits noirs indiquent les bandes protéiques détectées, les traits hachurés les zones ayant hydrolysé la gélatine. La mobilité relative de chaque bande (MR) est indiquée en fonction de la migration du bleu de bromophénol ajouté à chaque échantillon.

L'étude électrophorétique montre cependant qu'aucune de ces fractions n'est homogène et le test de digestion de la gélatine montre que pratiquement toutes les protéines principales de chaque fraction sont des protéases (fig. 5). La fraction T contient une protéase principale de mobilité relative (Rm) 70%, deux protéines sans activité enzymatique (83% et 42% de Rm) et une protéase (Rm 62%) qui se retrouve aussi dans la fraction C mais n'a presque pas d'activité protéolytique. Dans la fraction C, l'essentiel de l'activité protéolytique est due à 3 enzymes de mobilité relative 50%, 44% et 41%. Une protéase ayant une mobilité de 20% est présente en très petite quantité dans la fraction C et en quantité à peine supérieure dans la fraction CT. Cette fraction CT contient trois enzymes cationiques principales à forte activité protéolytique (Rm - 3%, - 8%, - 16%) et une protéase encore plus basique (Rm - 40% mais présente en très petite quantité. Il était donc souhaitable de mieux purifier ces enzymes pour pouvoir espérer établir des relations entre l'activité biologique et les caractéristiques enzymatiques.

Fractionnement par chromatographie d'affinité et échangeuse d'ions

Pour éviter les adsorptions d'impuretés sur les colonnes de chromatographie d'affinité, il s'est avéré utile de passer d'abord les sucs digestifs bruts sur une colonne de Sephadex G 100 (cf 1°) ce qui réalise une purification d'un facteur 3.

Les fractions contenant l'activité protéolytique sont regoupées et additionnées de KCl jusqu'à une concentration finale de 0,5 M/l pour empêcher les adsorptions non spécifiques. Cet échantillon est appliqué sur une colonne de chromatographie d'affinité où un inhibiteur compétitif de la trypsine, l'amino-4-benzamidine, est couplé à de la cellulose aminododécylique succinylée (FRITZ *et al.* 1972). Comme le montre la figure 6, l'activité chymotrypsique (BTEE) et une partie de l'activité trypsique (TAME) n'est pas retenue. Après rinçage de la colonne, un inhibiteur compétitif de la trypsine, la n-butylamine (INAGAMI, 1964) est ajouté au tampon, ce qui provoque l'élution d'un pic d'activité trypsique. Cette fraction qui correspond à la protéase T est ensuite dialysée et lyophilisée. Le rendement de cette expérience est de 100% pour l'activité chymotrypsique (non retenue sur la colonne) et de 80% pour l'activité trypsique dont un peu moins de la moitié se retrouve dans la fraction T.

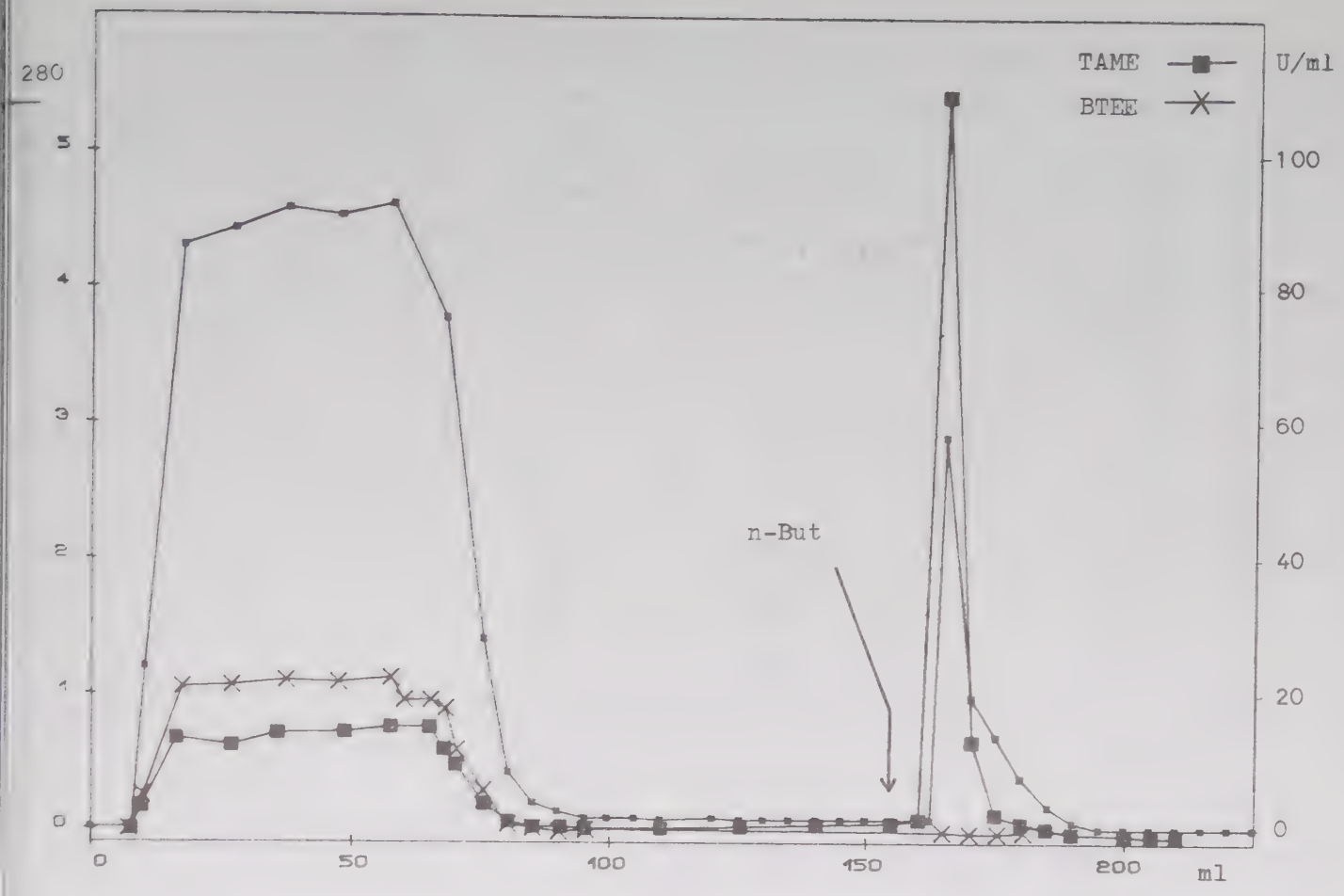


Fig. 6 - Chromatographie d'affinité de la fraction protéasique totale sur benzamidine-cellulose.

60 ml d'échantillon dans du Tris 50 mM/1 pH 8, KCl 0.5 M/1, préparé par filtration de sucs digestifs bruts sur Sephadex G 100 sont appliqués sur une colonne de benzamidine cellulose (0.9 x 16 cm). La colonne est d'abord éluée avec 100 ml du même tampon (27 ml/h) puis avec du tampon contenant en plus 0,5 M/1 de n-butylamine (n-But). Des fractions de 5 ml sont recueillies et leur densité optique à 280 nm (—●—) ainsi que leur activité estérolytique vis-à-vis du TAME (—■—) et du BTEE (—×—) est mesurée.

Après concentration par ultrafiltration, la fraction non retenue sur benzamidine-cellulose est débarrassée de toutes ses impuretés non protéasiques par une autre chromatographie d'affinité. L'inhibiteur des graines de soja (SBTI) est en effet un inhibiteur très puissant de toutes les protéases de *Sabellaria*. Couplé au Sephalose 4 B il retient de ce fait toute l'activité protéolytique comme le montre la figure 7. L'élution à pH acide utilisée pour les enzymes de boeuf (CHAUVET *et al.* 1973, JAMESON *et al.* 1974) est ici impossible car les protéases de *Sabellaria* sont irréversiblement dénaturées en milieu acide.

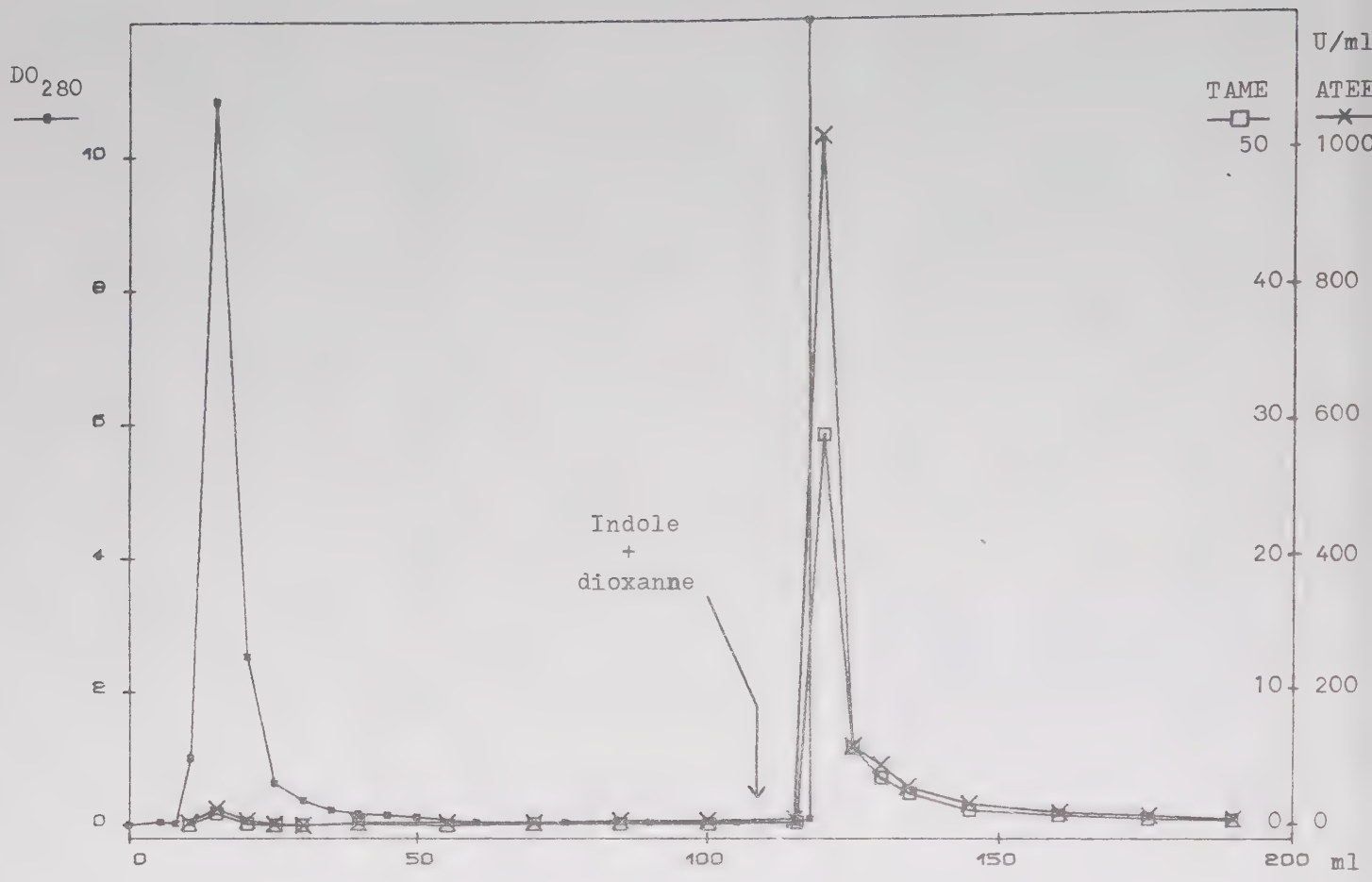


Fig. 7 - Chromatographie d'affinité sur SBTI-Sepharose

La fraction non retenue sur benzamidine-cellulose est concentrée à 5 ml et appliquée sur une colonne de SBTI-Sepharose (0.9 x 10 cm) équilibrée avec du Tris 50 mM/l pH 8, KCl 0.5 M/l. La colonne est ensuite éluée avec 100 ml du même tampon puis d'un tampon contenant en plus 20 mM/l d'indole et 20% de dioxanne. Des fractions de 5 ml sont recueillies et leur densité optique à 280 nm (—•—) ainsi que leur activité estérolytique vis-à-vis du TAME (—□—) et de l'ATEE (—×—) est mesurée.

Le décrochement est obtenu par action simultanée d'un inhibiteur compétitif de la chymotrypsine, l'indole (CUNNINGHAM, 1965), et d'un solvant organique, le dioxanne, qui diminue les interactions hydrophobes. L'intervention de ce type d'interaction a en effet été démontrée dans l'association de la trypsine avec l'inhibiteur pancréatique (CHOTIA *et al.* 1975) et utilisée pour la purification de l'α-chymotrypsine sur Sepharose substitué avec des résidus 2.4-dinitrophenyl (STEPANOV *et al.* 1975). Le rendement est médiocre : 50%

seulement de l'activité introduite est récupérée, néanmoins l'activité spécifique double. L'étude électrophorétique montre que l'activité disparue ne correspond pas à la perte d'une protéase particulière. D'autre part, des expériences témoins ne révèlent aucune dénaturation par l'éluant. Il faut donc attribuer cette perte à une désorption lente d'une fraction de chaque enzyme, comme le suggère l'aspect traînant du pic d'élution dans la figure 7.

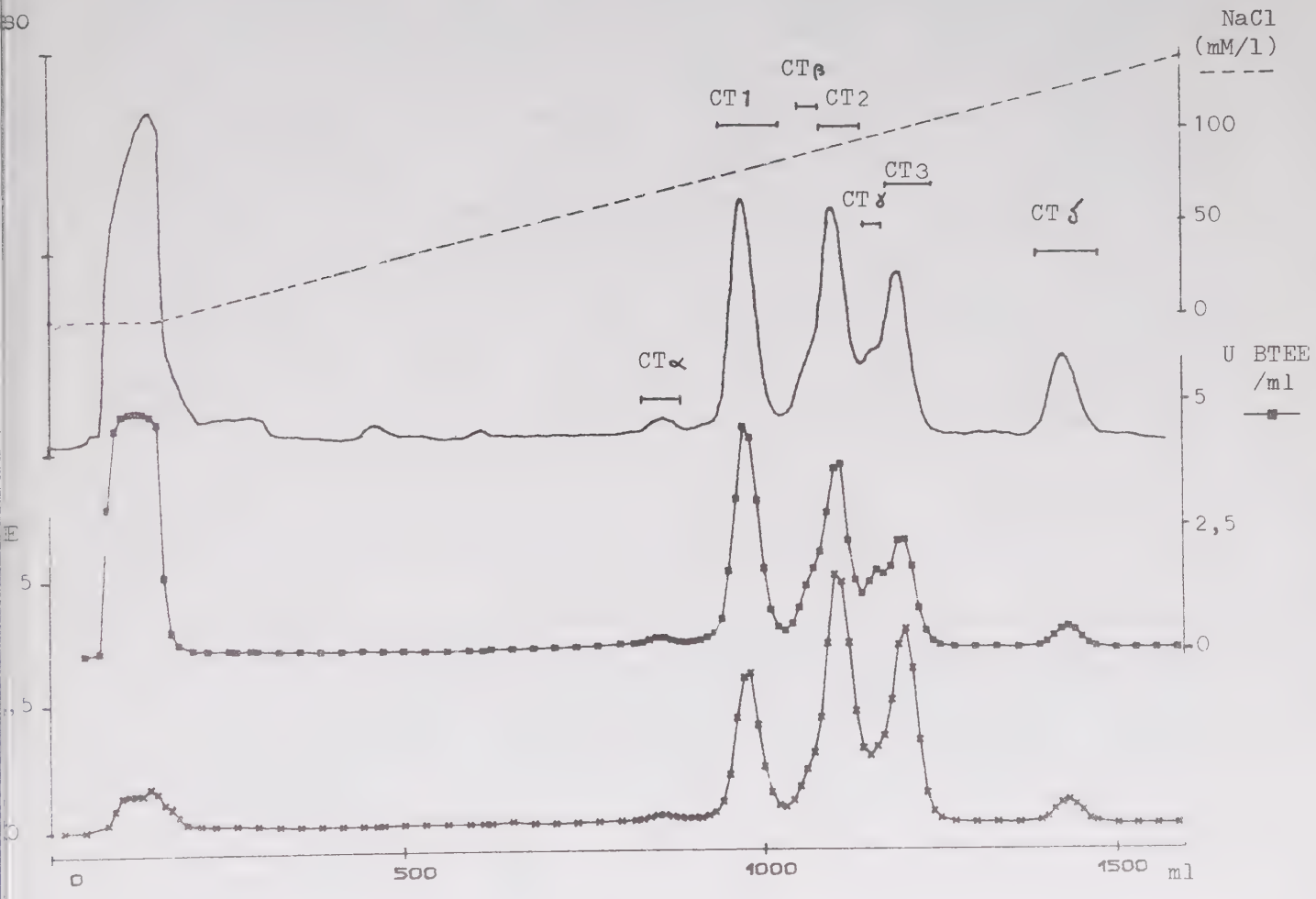


Fig. 8 - Chromatographie échangeuse d'ions sur CM-Sepharose

80 ml de protéases purifiées par chromatographie d'affinité sur SBTI-Sepharose, dans du tampon MES 10 mM/l pH 6 sont appliqués sur une colonne de CM-Sepharose CL6B (1,6 x 100 cm). La colonne est ensuite percolée (27 ml/h) avec un gradient de NaCl dans le même tampon (----). La densité optique à 280 nm de l'éluat est enregistrée en continu et des fractions de 10 ml sont recueillies. L'activité estérolytique des fractions vis-à-vis du BTEE (—■—) et du TAME (✳) est ensuite mesurée.

Les traits horizontaux indiquent les fractions enzymatiques conservées pour l'analyse ultérieure.

La séparation finale est obtenue par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Les protéases purifiées sur SBTI-Sepharose sont débarrassées de l'indole et du dioxanne par dessalage sur une colonne de Sephadex G 25 équilibré avec du Tris 50 mM/l, KCl 0.1M/l, pH 8.0, puis concentrées par ultrafiltration. Elles sont ensuite passées dans un tampon MES-NaOH 10 mM/l pH 6,0 par dessalage sur Sephadex G 25 et appliquées sur une colonne de CM-Sepharose CL 6 B, équilibrée avec le même tampon. La moitié de l'activité chymotryptique introduite n'est pas retenue sur cette colonne, alors que presque toute l'activité trypsique l'est (fig. 8). La colonne est ensuite éluée avec un gradient de NaCl dans le même tampon. L'essentiel de l'activité protéolytique est élué en trois pics (appelés CT_1, CT_2, CT_3) entre 80 et 110 mM/l de NaCl. Ces trois pics sont à peu près bien séparés mais présentent deux épaulements intermédiaires indiquant la présence de deux composés mineurs (CT_β et CT_γ). Deux autres enzymes mineures sont éluées l'une avant (CTα) l'autre après (CTδ) les trois enzymes principales. Toutes ces enzymes hydrolysent à la fois le TAME et le BTEE; elles correspondent donc aux composants cationiques précédemment isolés dans la fraction CT par filtration sur Ultrogel. Le rendement de cette chromatographie est normal puisque seule 20% environ de l'activité trypsique est perdue.

Les fractions non retenues dans l'expérience précédente sont ensuite passées par dessalage sur Sephadex G 25 dans un tampon Tris-Cl 10 mM/l, pH 8.0 et appliqués sur une colonne de DEAE-Sepharose CL6B. L'échantillon est intégralement retenu sur la colonne qui est alors éluée par un gradient de NaCl dans le même tampon. La première protéase à être éluée (Cα) à une activité estérolytique très faible, tandis que celle de la suivante (C_1) est mixte, comme les protéases cationiques du groupe CT. Les deux suivantes, C_2 et C_3 ont une activité surtout chymotrypsique tandis que le dernier pic représente à lui seul, la moitié de l'activité BTEE introduite et 80% de l'activité récupérée. Cette protéase C_4 qui n'a pratiquement pas d'activité trypsique correspond donc à l'enzyme essentielle de la fraction C précédemment purifiée sur Ultrogel.

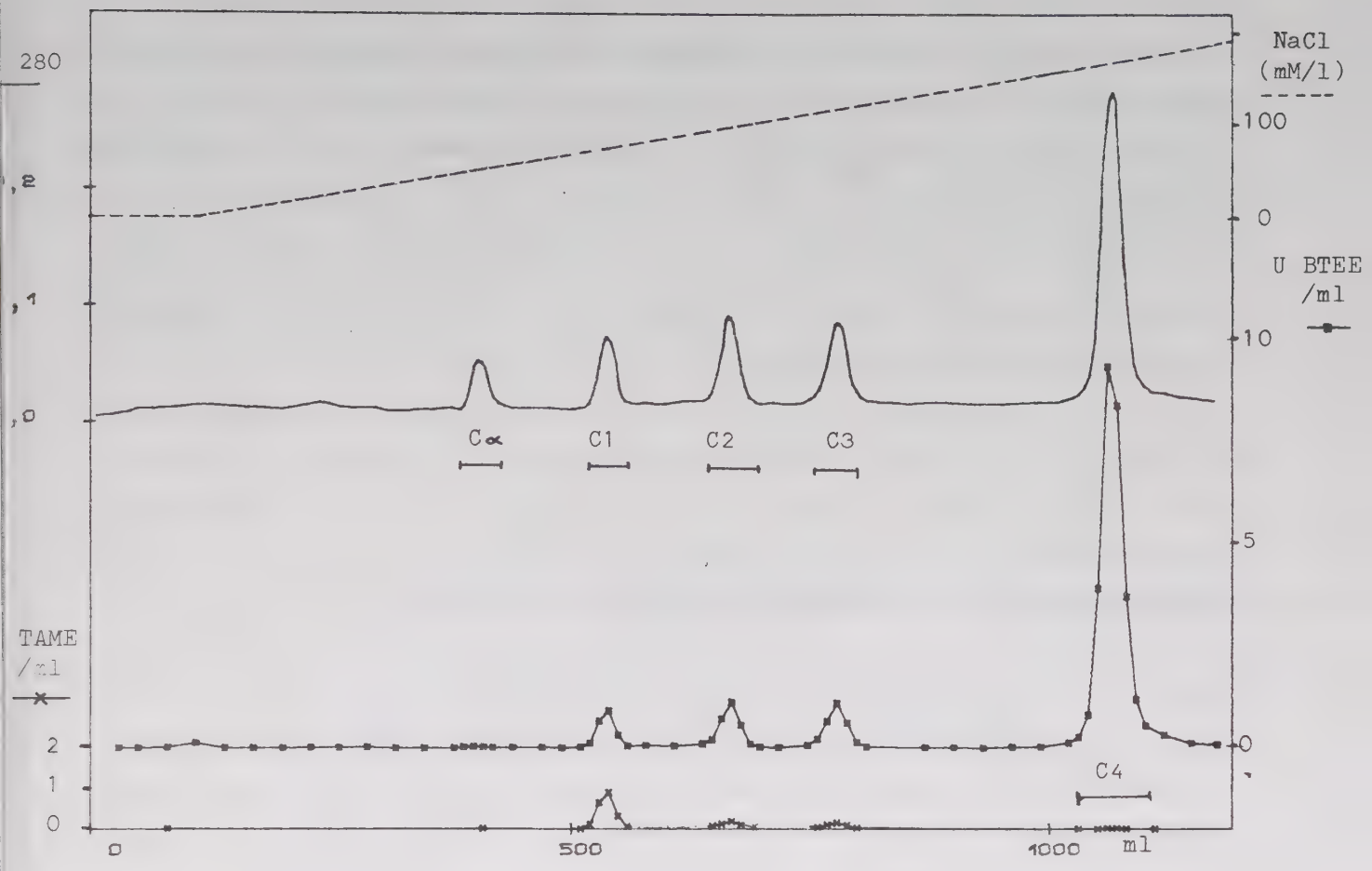


Fig. 9 - Chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-Sepharose

La fraction non retenue sur CM-Sepharose (40 ml), dans un tampon Tris 10 mM/l pH 8, est appliquée sur une colonne de DEAE-Sepharose CL6B (1.6 x 100 cm). La colonne est ensuite percolée (27 ml/h) avec un gradient de NaCl dans le même tampon (---). La densité optique à 280 nm de l'éluat est enregistrée en continu et des fractions de 10 ml sont recueillies. L'activité estérolytique des fractions vis-à-vis du BTEE (—■—) et du TAME (—*—) est ensuite mesurée.

Les traits horizontaux indiquent les fractions enzymatiques conservées pour l'analyse ultérieure.

Le tableau I récapitule le rendement des diverses étapes de la purification d'un échantillon de 8 ml de sucs digestifs purs extrait d'environ 2.000 animaux, mâles et femelles. Environ 100 mg de protéases purifiées sont finalement recueillies qui contiennent 45% de l'activité trypsique initiale et 30% de l'activité chymotrypsique. La chromatographie d'affinité des protéases à activité chymotrypsique occasionne des pertes importantes du fait des difficultés d'élution mais elle garantit que toutes les fractions purifiées sont des protéases fonctionnelles.

TABLEAU I - Données quantitatives sur la purification d'un échantillon de sucs digestifs

	ECHANTILLONS			PROTEASES PURIFIEES			
Etape	mg. de protéine *	U BTEE	U TAME	Appellation	mg. de protéines *	U BTEE	U TAME
Sucs digestifs bruts	1.736	2.887	2.163				
Sephadex G 100	628	2.163	3.393				
Benzamidine cellulose	511	2.169	1.545	T	36	0	1.226
SBTI-Sepharose	112	1.066	826				
CM Sepharose	29	511	57	CT_α	1,2	11	8
				CT_1	13	175	124
				CT_β	2,9	44	39
				CT_2	13	142	215
				CT_γ	4,6	68	52
				CT_3	8,3	92	140
				CT_δ	5,3	20	17
DEA Sepharose				C_α	0,9	1,0	0,9
				C_1	1,5	19	19
				C_2	2,4	24	5,1
				C_3	2,0	21	4,1
				C_4	9,4	247	0,6
Total					100	863	1 850

* Evalués par mesure de la D.O. 280 nm

Une autre méthode de chromatographie d'affinité, spécifique de la chymotrypsine, développée par CUATRECASAS *et al.* (1968) a été également essayée. L'inhibiteur compétitif de la chymotrypsine, l'ester méthylique de D tryptophane (DTME), y est lié au sépharose par l'intermédiaire d'une molécule d'acide ε-amino-caproique. Elle devait permettre la séparation différentielle des enzymes de type C et CT car le DTME inhibe 5 fois plus l'activité sur ATEE de la fraction C (obtenue par filtration sur Ultrogel) que celle de la fraction CT. Effectivement toutes les protéases mixtes étaient à peine retardées sur DTME-Sepharose alors que la protéase C_4 était seule retenue. Cette méthode a été abandonnée car après plusieurs utilisations, même la protéase C_4 n'était plus retenue mais seulement retardée. Ce n'est pas très surprenant car la chymotrypsine bovine, elle aussi, n'est pas très fortement retenue sur ce type de colonne (CUATRECASAS *et al.* 1968) et cette rétention est en grande partie due à des interactions électrostatiques non spécifiques (SHARMA *et al.* 1975).

La pureté des principales protéases isolées est satisfaisante puisque en électrophorèse bidirectionnelle, elles ne donnent qu'une seule bande (Planche XII A). Seules les protéases cationiques mineures CT_β et CT_γ ne sont pas séparées de leurs voisines. Toutes les protéases repérées après filtration sur gel sont retrouvées, à l'exception d'une protéase C à faible activité qui, en électrophorèse sur Indubiose migrait plus vite que la protéase C_4 (Rm 0,62, fig. 5) et qui n'a sans doute pas été éluée de la colonne de DEAE-Sepharose.

La focalisation au point isoélectrique montre que cette pureté n'est pas parfaite mais que dans chaque fraction les quantités de contaminants sont faibles par rapport à l'enzyme caractéristique, sauf évidemment pour les fractions CT_β et CT_γ (Planche XII, B).

Propriétés physicochimiques et enzymatiques des protéases purifiées

- *Point isoélectrique*

Comme le montre la planche XII, B, toutes les protéases sont très chargées soit négativement (CT) soit positivement (C et T), seule la protéase CT_1 à un point isoélectrique (Pi) à peu près neutre ($\cong$ 6,8). Pour cinq d'entre elles, le point isoélectrique n'est même pas mesurable car situé en dehors de la gamme de Pi des ampholines utilisées : T, C_4 et C_3 ont un Pi $\leq$ 3,3, tandis que CT_3 et CTδ ont un Pi $\geq$ 9,1 et même probablement à 10 pour CTδ. Les autres sont toutes nettement acides avec un Pi de 3,5 pour C_2 4,0 pour C_1, et 4,2 pour C_α ou basique : 8,3 pour CT_2. Il est *a priori* surprenant que les protéases qui ressemblent le plus à celles de boeuf (T et C_4) aient des points isoélectriques totalement opposés puisque le Pi de la trypsine est 10,8 et celui de l'α-chymotrypsine 8,1. En fait, il ne semble pas qu'il y ait de relation entre le point isoélectrique et le type de protéase qui soit valable pour tout le règne animal (RIGHETTI *et al.* 1976, 1981).

- *Poids moléculaire*

L'électrophorèse en présence de sodium dodécyl-sulfate (SDS) est plus fiable que la filtration sur gel pour la détermination des poids moléculaires (voir annexe I). Comme le montre la figure 10, qui cumule les résultats de cinq séries de mesures indépendantes, l'électrophorèse avec SDS donne les poids moléculaires des marqueurs avec une erreur généralement inférieure à

LEGENDE DE LA PLANCHE XII

Analyse des protéases purifiées

A Electrophorèse bidirectionnelle en tampon taurine-imidazole :

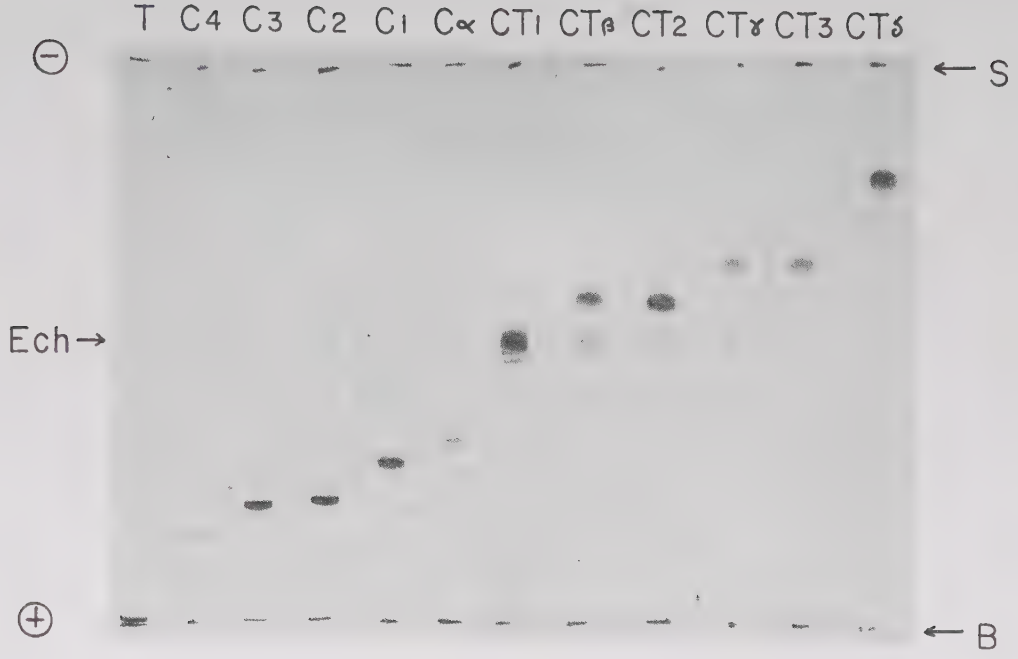
Un échantillon de chaque protéase (inactivée au PMSF) est introduit entre les deux gels (Ech). Après électrophorèse la position des marqueurs, safranine (S) et bleu de bromophénol (B), est repérée à l'encre de chine puis les gels sont colorés au bleu de coomassie.

B Focalisation au point isoélectrique sur plaque LKB :

Des échantillons identiques à l'expérience A sont déposés sur la plaque et soumis à focalisation à 4°C. Deux bandes de gel sont prélevées et divisées en 20 fragments (5 mm/5 mm), les fragments homologues sont additionnés de 0.25 ml d'eau distillée et, après 24 h d'équilibration, le pH est mesuré à 4°. Le reste du gel est coloré au bleu de coomassie.

PLANCHE XII

A



B

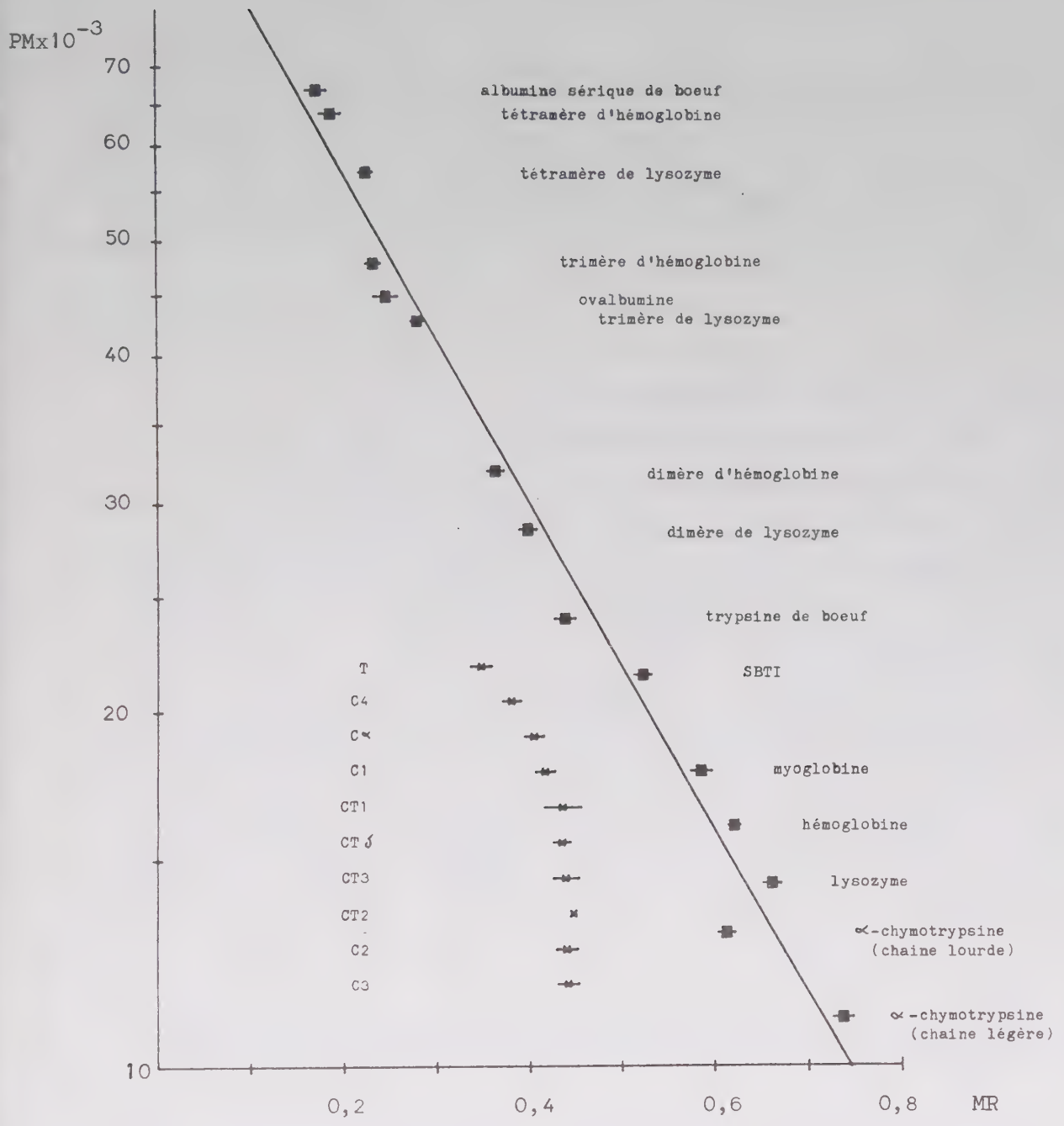


Fig. 10 - Evaluation des poids moléculaires par électrophorèse avec SDS.

Moyenne de 5 séries d'électrophorèses sur gels de polyacrylamide (15%) en tubes (0.7 x 14 cm). Dans chaque série la mobilité relative des protéases (inactivées au PMSF) par rapport au bleu de bromophénol (MR) est mesurée (x) ainsi que celle de protéines marqueurs ( ). L'écart-type de la moyenne est indiqué par le trait horizontal. La droite de régression est calculée en supposant une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire des marqueurs et la mobilité relative.

10%. Pour les protéases purifiées, on constate que toutes les protéases du groupe CT ainsi que C_2 et C_3 ont des mobilités relatives pratiquement identiques correspondant à un poids moléculaire d'environ 27.000 daltons. C_1, C_α, C_4 et T ont des MR significativement différentes correspondant à des poids moléculaires échelonnés entre 28.000 et 35.000 daltons (voir Tableau II).

On remarque que ces poids moléculaires sont significativement supérieurs à ceux déduits des filtrations sur gel, même en Sephadex. Malgré le traitement des échantillons par le β-mercaptoethanol 2 minutes à 100°C, chaque protéase migre en une seule bande alors que dans les mêmes conditions l'α-chymotrypsine donne deux bandes. Ceci implique que les protéases de *Sabellaria* ne comportent chacune qu'une seule chaîne d'acides aminés. Toutefois après plusieurs cycles de congélation et d'ébullition, les protéases du groupe CT sont partiellement dégradées en polypeptides de poids moléculaire inférieur ou égal à 12.000 daltons.

- *Présence de résidus glucidiques*

Les glycoprotéines sont connues pour donner des déterminations de poids moléculaire erroné, aussi bien en filtration sur gel (WHITAKER, 1963) qu'en électrophorèse SDS (LEACH *et al.* 1980 a) et certaines comme l'acrosine (SCHLEUNING *et al.* 1976) ou la bromélaine (MURACHI, 1976) sont des protéases.

TABLEAU II - Poids moléculaires déterminés par électrophorèse avec SDS

Enzyme	Poids moléculaire	Enzyme	Poids moléculaire
T	35.600 ± 600 *	C_α	29.800 ± 500
C_4	31.100 ± 500	CT_1	27.200 ± 1300
C_3	26.500 ± 400	CT_2	26.700 ± 200
C_2	26.600 ± 500	CT_3	26.800 ± 800
C_1	28.600 ± 500	CT_δ	27.000 ± 400

* Ecart-type de la moyenne

Ces propriétés ont amené à rechercher la présence de glucides dans les protéases T, C_4 et CT_2 par traitement à l'acide périodique et réactif de Schiff après électrophorèse. Aucune coloration rose n'est apparue dans les gels contenant 0,2 à 0,4 mg de protéase alors que la bande correspondant à 0,1 mg d'ovalbumine (qui contient 3.5% de glucides) était distinctement colorée. Ces protéases ne contiennent donc vraisemblablement pas de résidus glucidiques, ou moins de 1% en tous cas, ce qui serait insuffisant à créer un comportement anormal en chromatographie ou en électrophorèse.

- *Influences ioniques sur la stabilité et l'activité*

Toutes les protéases de *Sabellaria* sont irréversiblement inactivées à pH 3, alors que c'est à ce pH que la trypsine et la chymotrypsine de boeuf sont les plus stables. Les pH optimum pour l'hydrolyse enzymatique sont tous basiques (fig. 11) : alors que l'hydrolyse est nulle à pH 4 et encore faible à pH 7, elle culmine vers 9 et ne chute qu'au délà de 10. Il semble d'ailleurs qu'à pH 11, l'activité enzymatique de T et C_4 soit toujours maximale mais que ces enzymes soient seulement plus sensibles à la dénaturation ther-

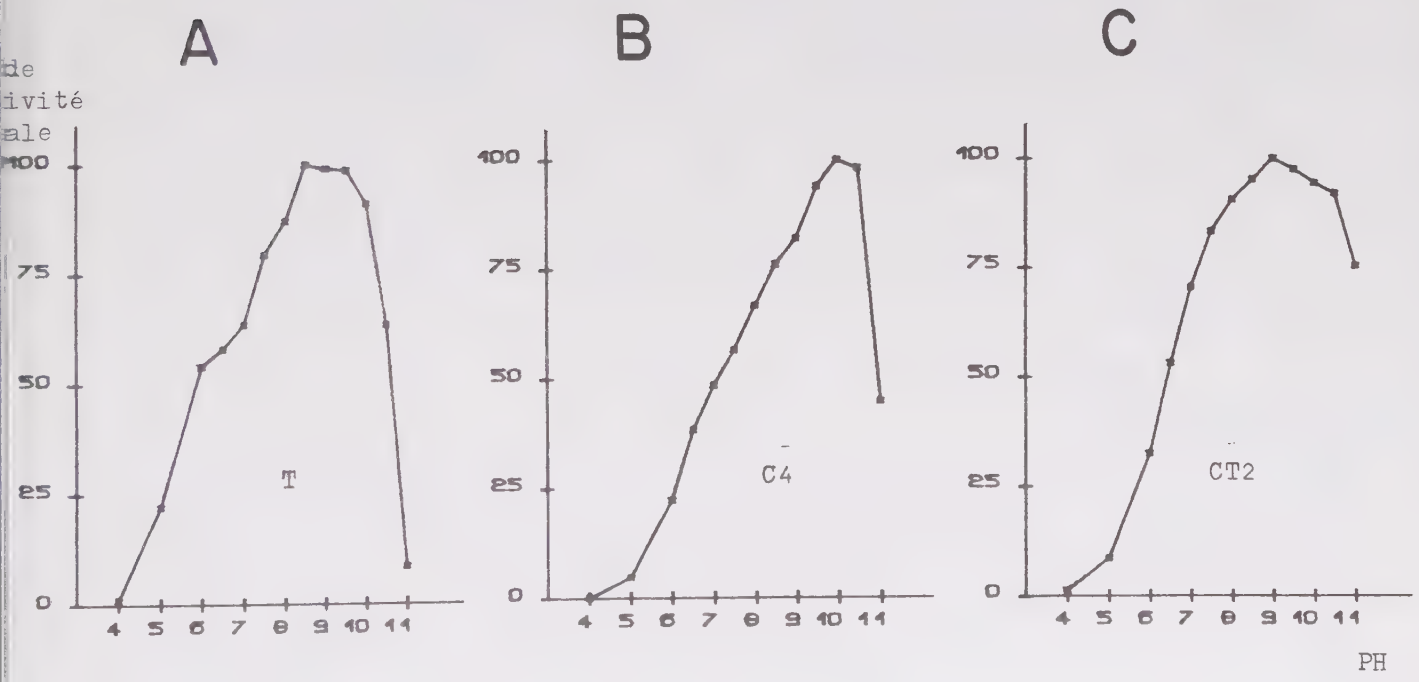


Fig. 11 - pH optimum pour l'activité protéolytique

La protéolyse du Hide Powder Azure par les protéases T (A), C_4 (B) et CT_2 (C) est mesurée après 30 min d'incubation à 37°C à divers pH. La solution d'incubation contient de la glycine, du Tris, du MES, de l'acide acétique (0.5 M/1 de chaque) et 10 mM/1 de $CaCl_2$. Elle est ajustée au pH voulu à 37°C avec HCl ou NaOH concentré.

mique. En effet, lorsque l'hydrolyse du HPA par la protéase C_4 est faite à 25° au lieu de 37°, le pH optimum est de 11. De même à 25° le BAEE est hydrolysé à pH 11 par la protéase T à 75% de sa vitesse maximale (pH 9,5). Ces résultats sont assez surprenants car le pH du suc digestif est à peine supérieur à 8, mais ils ont été confirmés avec d'autres substrats.

Toutes les mesures de caractéristiques enzymatiques ont néanmoins été faites à pH 8 car c'est à ce pH que les protéases exercent leur activité sur la réinitiation de la méiose et vraisemblablement aussi leur fonction digestive.

Les ions divalents et notamment le calcium sont connus pour affecter la stabilité ou la catalyse des enzymes : en présence de calcium, la trypsine et l'α-chymotrypsine de boeuf s'autolysent moins vite (WALSH, 1970; WILCOX, 1970). Comme le montre le tableau III, cet effet stabilisateur est évident pour la protéase T, alors que les autres sont soit indifférentes au calcium, soit, comme C_2 et C_3, légèrement inactivées à partir de 1mM/l de calcium. Aucun autre ion divalent ne semble important pour ces enzymes puisque l'EDTA, qui inhibe complètement les métalloproteinases comme la thermolysine (MATSUBARA, 1970) ou active la papaine (ARNON, 1970), n'a pas plus d'effet que la simple absence de calcium. Aucun groupe sulfhydryle n'est nécessaire à l'activité enzymatique, puisque le p-chloromercuribenzoate (PCMB) n'a pas d'effet inhibiteur. Au contraire, il stimule l'activité des protéases C_1, CT_1, CT_2, CT_3, ce qui suggère qu'un ou plusieurs groupes sulhydryles ont un rôle néfaste sur la catalyse chez ces enzymes. Ces divers résultats confirment par élimination que toutes les enzymes de *Sabellaria* appartiennent au groupe des protéases à sérine selon la classification de HARTLEY (1960).

TABLEAU III - Influence des ions divalents et des groupements sulfhydryles sur l'activité estérolytique des protéases.

Milieu d'incubation (30 min à 25°)	% activité résiduelle par rapport aux témoins Ca 10 mM/l								
	T*	C_4	C_3	C_2	C_1	CT_1	CT_2	CT_3	CT_δ
Ca 1 mM/l	74%	90%	109%	97%	98%	96%	100%	97%	104%
Ca 0	68%	93%	112%	119%	98%	97%	97%	97%	100%
EDTA 10 mM/l	67%	94%	109%	117%	98%	98%	96%	102%	100%
PCMB 0.5mM/l	98%	82%	98%	95%	142%	147%	149%	138%	101%

* Activité vis-à-vis du TAME; les autres sont testées avec le BTEE.

- Inhibiteurs irréversibles

Ainsi que l'avaient indiqué les essais sur les fractions partiellement purifiées, toutes les protéases isolées sont sensibles au PMSF. Toutes les inhibitions suivent une cinétique du 1er ordre mais avec des vitesses de réaction très différentes comme le montre le tableau IV. Pour comparaison, ont été également portées dans ce tableau les activités résiduelles de la trypsine et chymotrypsine de boeuf calculées d'après les données de la littérature. La protéase T est inactivée encore plus lentement que la trypsine de boeuf (k_2 = 6 et 520 $1.M^{-1}.min^{-1}$ respectivement) alors que C_4 est aussi sensible que l'α-chymotrypsine (k_2 = 1.4 10^4 $1.M^{-1}$ min^{-1} dans les deux cas) Les protéases C_2 et C_3 sont deux fois moins sensibles et les autres (C_1, CT_1 CT_2, CT_3, CTδ) encore deux fois moins sensibles. Seule la protéase T est inactivée par le TLCK mais presque 50 fois plus vite que la trypsine (k_2 = 2.3 x 10^4 et 5.2 x 10^2 $1.M^{-1}.min^{-1}$, respectivement). Toutes les protéases de type C et CT sont inactivées par les chloromethyl cétones à base de phénylalanine : TPCK et ZPCK. Là aussi, la protéase C_4 se montre plus sensible que la chymotrypsine. On remarque à nouveau que les protéases C_2 et C_3 ont des taux d'inactivation très voisins ainsi que les protéases C_1, CT_1, CT_2, CT_3. Ces inhibitions semblent indiquer l'intervention dans le site actif d'un résidu sérine, quoique la spécificité du PMSF ait été ré-

TABLEAU IV - Sensibilité des protéases aux inhibiteurs irréversibles

Inhibiteur	% d'activité résiduelle après 10 min d'incubation à 25°C avec 50 µM/l d'inhibiteur										
	T (a)	C_4 (a)	C_3	C_2	C_1	CT_1	CT_2	CT_3	CT_δ	Trypsine (b)	α chymo (b)
PMSF	97%	0,1%	1,8%	2,7%	14%	11%	16%	23%	11%	87%	0.1%
TLCK	< 0,1%	100%	93%	93%	100%	103%	99%	106%	96%	77%	100%
TPCK	100%	13%	82%	80%	37%	44%	48%	46%	65%	100%	79%
ZPCK	100%	< 0,1%	71%	72%	27%	30%	32%	34%	48%	100%	13%

a) Valeurs calculées d'après les mesures de k_2. Les substrats utilisés sont le TAME (T), le BTEE (C_4) et le GGPNA pour les autres.

b) Valeurs calculées d'après FARHNEY *et al.* (1963), SHAW *et al.* (1970 et 1971).

cemment mise en doute (SEKAR *et al.* 1979), et de résidus histidine. Le fait que les enzymes à activité chymotrypsique soient inactivées presque autant par le TPCK que par le ZPCK laisse penser que leur site actif est du type vertébré plutôt que microbien (NEURATH *et al.* 1967), puisque les subtilisines bactériennes sont inactivées par le ZPCK mais pas par le TPCK (SHAW *et al.* 1968).

- *Spécificité de substrat*

Pour la détermination des activités spécifiques, la concentration en enzyme active a été mesurée par plusieurs méthodes, spectrophotométriques et fluorimétriques. Les protéases à activité chymotrypsique (C et CT) ont d'abord été dosées par un inhibiteur irréversible chromogène, le NCDC (ERLANGER *et al.* 1964) mais outre qu'elle est peu sensible, cette méthode est d'une reproductibilité médiocre, car les moindres fluctuations du taux de calcium entraînent soit des résultats sous estimés, soit l'apparition d'une turbidité. La protéase T a de même été dosée avec le p-NPGB qui libère du p-nitrophénol lors de la formation de l'acyl-enzyme (CHASE *et al.* 1970). Cependant le dosage spectrofluorimétrique avec un titrant équivalent (MUGB) où la méthylumbelliferone (fluorescente) (MU) remplace le nitrophénol, s'est avéré plus sensible (COLEMAN *et al.* 1976). Comme le montre la figure 12 A, en présence d'un excès de MUGB, chaque addition de protéase T entraîne la libération brusque de MU car la formation de l'acyl-enzyme est quasi instantanée, alors que la déacylation est extrêmement lente. Par contre, les

Légende de la figure 12

Cinétiques de titration des sites actifs par spectrofluorimétrie

A - Libération de méthylumbelliferone (MU) par le MUGB sous l'action de la protéase T.

A 3 ml de tampon phosphate 0.1 M/l pH 6 sont d'abord ajoutés 50 µl de MUGB (1 mM/l dans le DMF) puis 3 fois 50 µl de protéase T (4°/$_{oo}$).

B - Action de la protéase CT sur le MUGB.

Même protocole qu'en A mais une seule addition de protéase CT_2 (3°/$_{oo}$).

C - Action de la protéase CT sur le MUTMAC.

A 3 ml de tampon phosphate 0.1 M/l pH 7.4 sont d'abord ajoutés 50 µl de MUTMAC (0.2 mM/l dans l'eau distillée) puis 100µl de protéase CT_2 (3°/$_{oo}$) et ensuite 50 µl de MUTMAC pour vérifier que la première hydrolyse n'avait pas été totale.

Les traits noirs sur l'axe des abscisses indiquent les périodes où les mesures de fluorescence sont interrompues.

FIGURE 12

Le tableau I récapitule le rendement des diverses étapes de la purification d'un échantillon de 8 ml de sucs digestifs purs extrait d'environ 2.000 animaux, mâles et femelles. Environ 100 mg de protéases purifiées sont finalement recueillies qui contiennent 45% de l'activité trypsique initiale et 30% de l'activité chymotrypsique. La chromatographie d'affinité des protéases à activité chymotrypsique occasionne des pertes importantes du fait des difficultés d'élution mais elle garantit que toutes les fractions purifiées sont des protéases fonctionnelles.

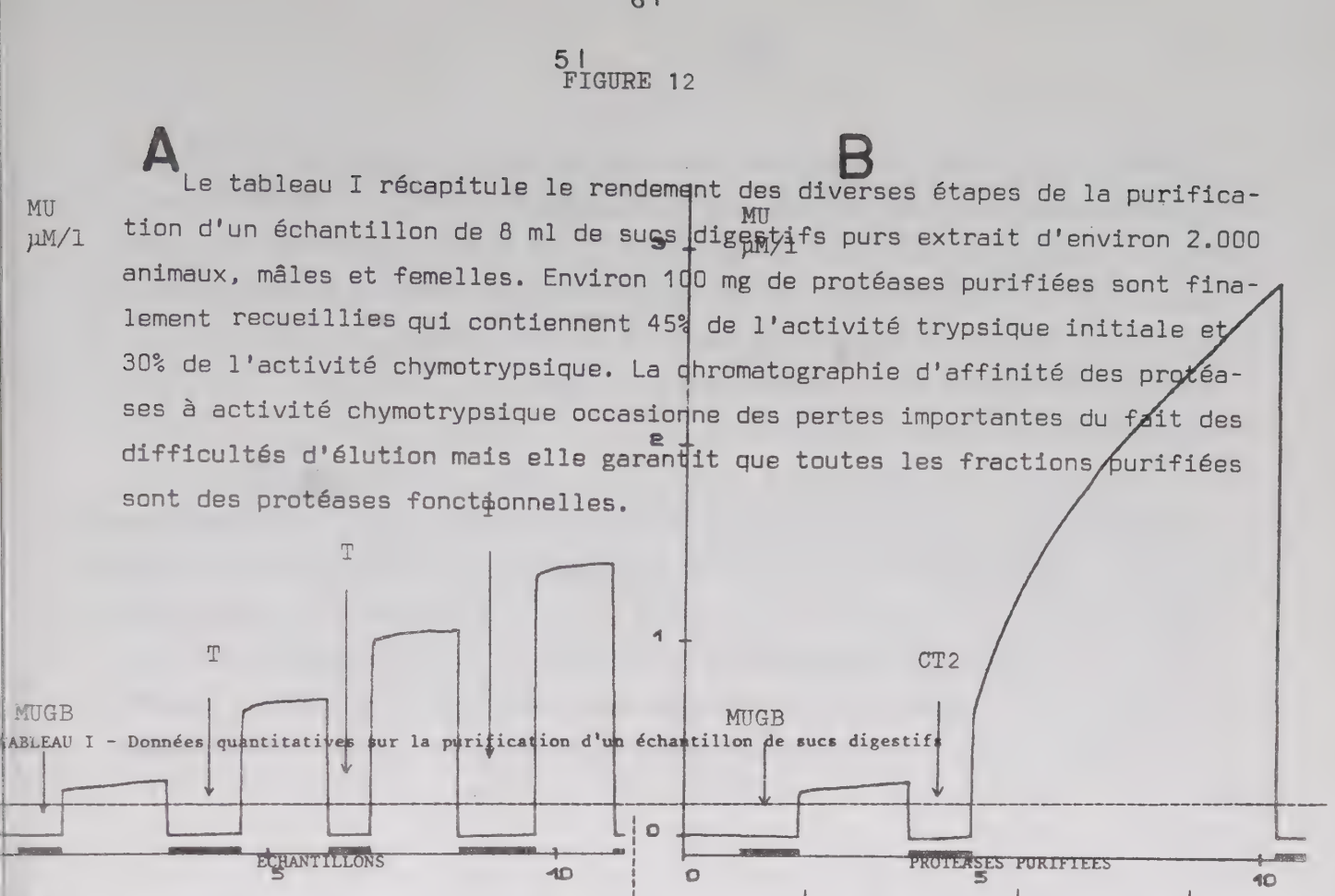
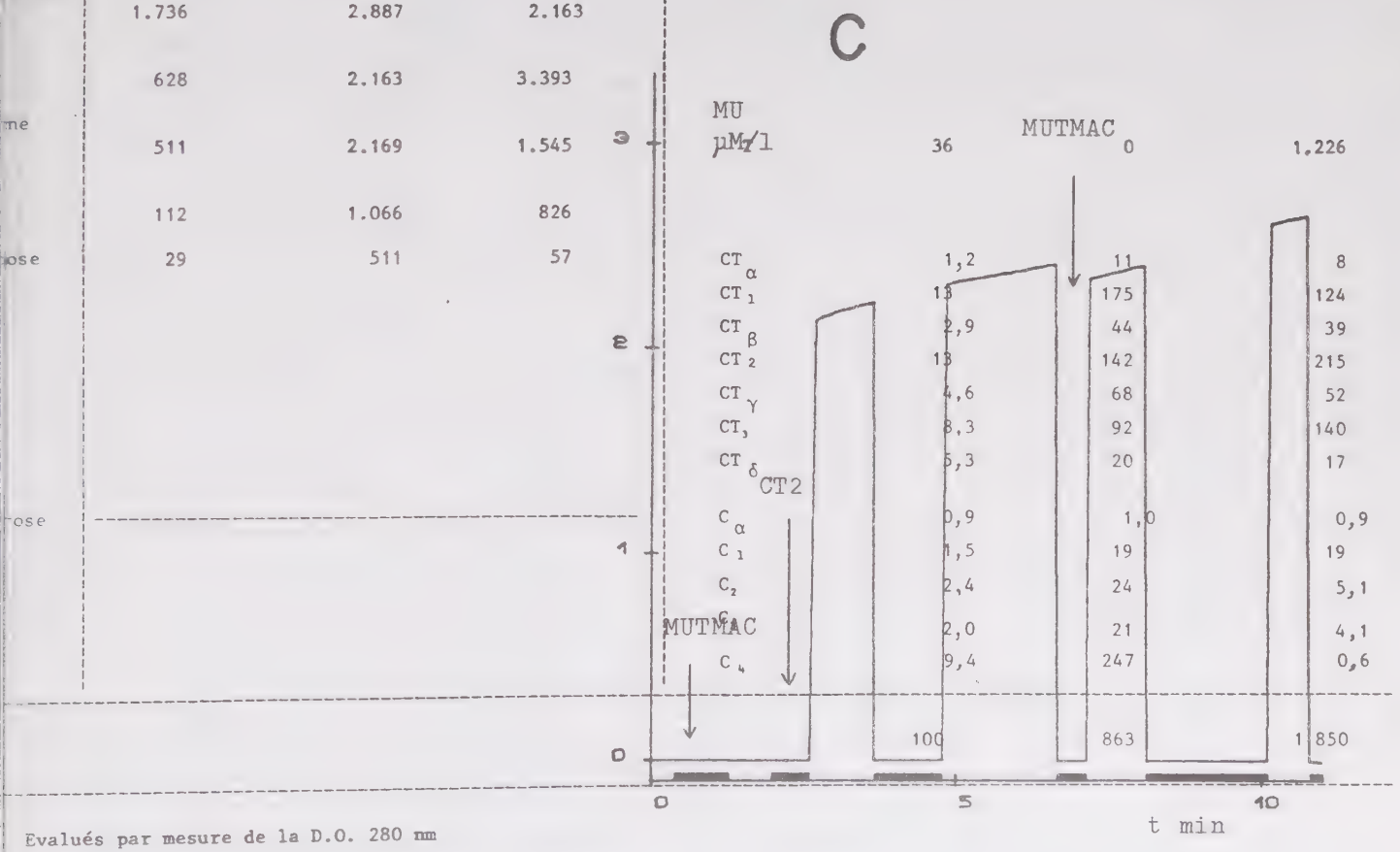


TABLEAU I - Données quantitatives sur la purification d'un échantillon de sucs digestifs

	mg. de protéine *	U BTEE	U TAME
stifs	1.736	2.887	2.163
	628	2.163	3.393
ne	511	2.169	1.545
	112	1.066	826
ose	29	511	57

Appellation	mg. de protéines *	U BTEE	U TAME
CT_α	1,2	11	8
CT_1	13	175	124
CT_β	2,9	44	39
CT_2	13	142	215
CT_γ	4,6	68	52
CT_3	8,3	92	140
CT_δ	5,3	20	17
C_α	0,9	1,0	0,9
C_1	1,5	19	19
C_2	2,4	24	5,1
C_3	2,0	21	4,1
C_4	9,4	247	0,6
	100	863	1 850



Evalués par mesure de la D.O. 280 nm

protéases CT, bien qu'ayant une activité trypsique (hydrolyse du TAME) ne sont pas dosables avec le MUGB car la déacylation est trop rapide (Fig. 12 B), ce qui confirme leur affinité avec l'α-chymotrypsine qui réagit de même avec le p-NPGB (CHASE *et al.* 1970). Elles sont d'ailleurs bien dosables par le MUTMAC, un titrant spécifique de la chymotrypsine (JAMESON *et al.* 1973) (fig. 12 C), car, comme pour les protéases C, l'acylation est immédiate et la déacylation très lente.

Le tableau V récapitule les activités spécifiques ainsi trouvées pour chaque enzyme avec les deux substrats synthétiques usuels et le hide powder azure, comme substrat protéique. L'activité protéinolytique (HPA) est assez homogène et comprise entre les valeurs de la chymotrypsine et de la trypsine de boeuf. Seule fait exception la protéase C_α qui a une activité 10 fois plus forte mais présente par ailleurs des singularités suspectes. En effet, la concentration en protéine de cette fraction calculée d'après la titra-

TABLEAU V - Activité spécifique des protéases

Substrat	Activités spécifiques (u/nano M d'enzymes)						
	T	C_4	C_3	C_2	C_1	C_α	CT_α
TAME	3,3	0,003	0,007	0,008	0,44	0,27	0,37
BTEE	0	0,83	0,39	0,39	0,44	0,30	0,49
HPA	1,5	0,57	1,2	1,2	3,7	17	2,1

	CT_1	CT_2	CT_3	CT_δ	Trypsine	α-chymo
TAME	0,39	0,53	0,70	0,13	8,2	0
BTEE	0,54	0,35	0,46	0,15	0	1,1
HPA	1,7	2,0	3,2	2,6	4,3	0,28

Les concentrations en protéases ont été déterminées par titration des sites actifs avec le MUGB (T et trypsine) ou le MUTMAC (α-chymotrypsine et toutes les autres protéases).

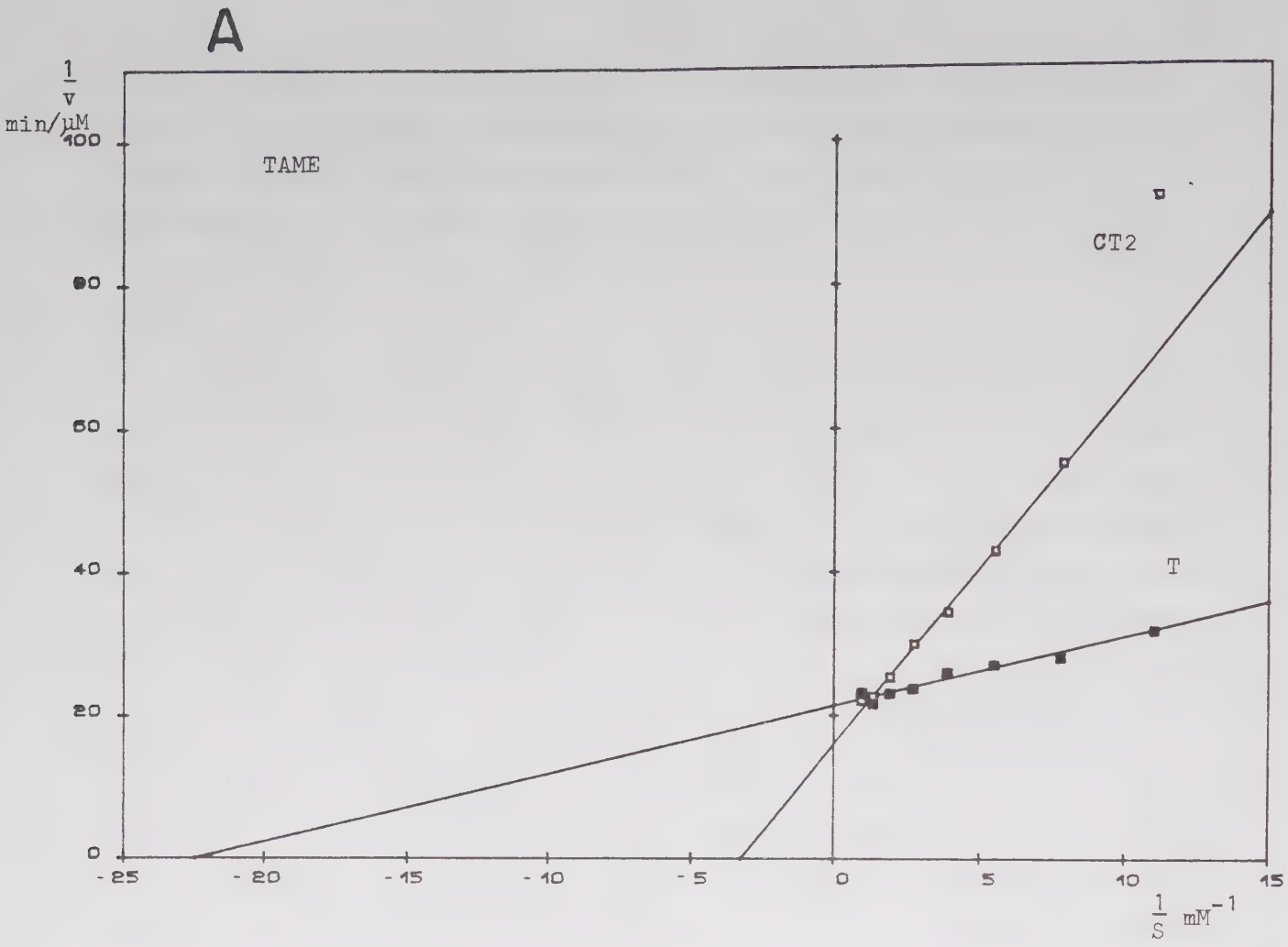
tion au MUGB et son poids moléculaire est 10 fois plus faible que la concentration estimée par mesure de DO à 280 nm. Malheureusement, cette protéase a été purifiée en trop faible quantité pour pouvoir être analysée plus en détail. Pour le reste, les activités spécifiques mesurées correspondent aux affinités déjà observées avec les inhibiteurs : T est très proche de la trypsine de boeuf, comme C_4 de la chymotrypsine, C_2 et C_3 s'en distinguent un peu plus et toute la série de C_1 à CT_3 a pratiquement la même activité sur le TAME que sur le BTEE. Quelques mesures des constantes cinétiques ont été faites pour comparer le degré de spécificité des protéases CT vis-à-vis d'un substrat de la trypsine, le TAME et d'un substrat de la chymotrypsine le glutaryl-glycyl-glycyl-L-phenylalanine-β-naphthylamide (GGPNA). Ce substrat a été préféré au BTEE car il est soluble dans l'eau alors que le BTEE n'est soluble qu'en présence de 30% de méthanol et il a été remarqué que les protéases C_4 et CT étaient très sensibles aux solvants organiques. Ainsi pour l'hydrolyse du BTEE par C_4 la Vmax n'est pas modifiée (Kcat : 100 sec^{-1}) mais le Km passe de 0.4 mM/l avec 15% de méthanol à 2.7 mM/l avec 30% de méthanol. Comme le montrent la figure 13 et le tableau VI, la protéase CT_2 est capable d'hydrolyser les deux types de substrats mais avec une efficacité moindre que les enzymes spécifiques. Cependant les deux constantes ne sont pas affectées de la même façon pour les deux substrats. Ainsi, pour l'activité trypsique, la protéase CT a à la fois moins d'affinité pour le

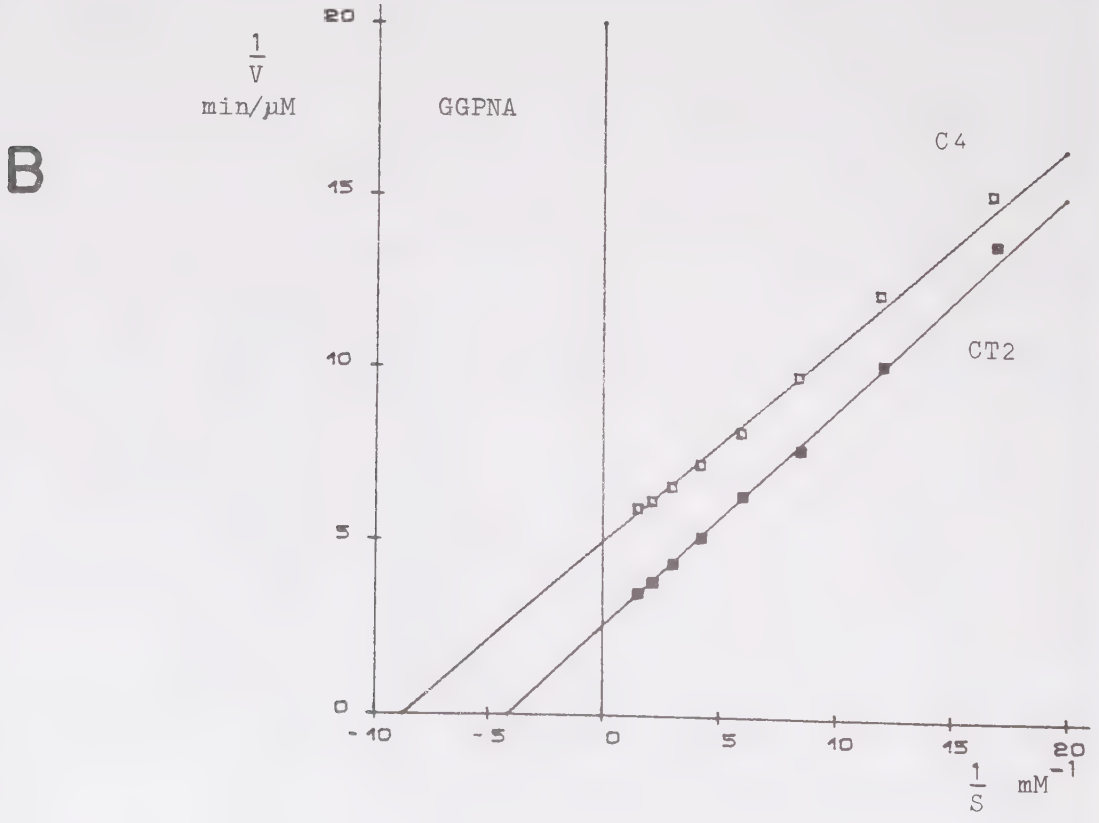
TABLEAU VI - Constantes cinétiques apparentes de l'hydrolyse de deux substrats par les protéases

Enzyme	Substrat	Constantes apparentes (± écart-type) à 25°C		
		KM (µM/l)	Kcat (sec^{-1})	$\frac{Kcat}{Km}$ ($1\ sec^{-1} M^{-1}$)
Trypsine *	TAME	12,5	100	8.000.000
T		44,6 ± 7	84,4 ± 2,4	1.870.000
CT_2		305 ± 49	13,4 ± 1.9	43.900
	GGPNA	244 ± 7	0,0090 ± 0,0008	37
C_4		114 ± 6	0,042 ± 0,004	371
α chymotrypsine		289 ± 7	0,110 ± 0,004	381

* D'après TROWBRIDGE *et al.* (1963); cf WALSH (1970)

FIGURE 13


A
1/v
min/µM
TAME
CT2
T
100
80
60
40
20
0
-25
-20
-15
-10
-5
0
5
10
15
1/S mM-1


B
1/V
min/µM
GGPNA
C4
CT2
20
15
10
5
0
-10
-5
0
5
10
15
20
1/S mM-1

Légende de la figure 13

Détermination des constantes de Michaelis en coordonnées réciproques

A - Variation de la vitesse initiale d'hydrolyse du TAME (V) par les protéases T et CT_2 en fonction de sa concentration (S).

B - Variation de la vitesse initiale d'hydrolyse du GGPNA (V) par les protéases C_4 et CT_2 en fonction de sa concentration (S).

Les droites correspondent aux valeurs de Km et Vmax déterminées par la méthode de Wilkinson à partir de ces mesures.

TAME (Km élevé) et l'hydrolyse moins vite une fois fixé (Kcat faible) que les enzymes plus spécifiques comme T ou la trypsine. Par contre, pour l'activité chymotrypsique, l'affinité est normale et seule l'hydrolyse est moins efficace. C'est sans doute la raison pour laquelle les protéases CT ont plus de ressemblance avec la chymotrypsine qu'avec la trypsine.

La spécificité de l'activité estérolytique pour les diverses catégories d'acides aminés a été étudiée pour les protéases T, C_4 et CT_2 avec une série d'esters du p-nitrophénol (ONp) de divers acides aminés tous N-substitués avec un groupement carbobenzyloxyle (z) (tableau VII). Les divers dérivés d'acides aminés aliphatiques (Z-Gly-ONp, Z-L-Ala-ONp et Z-L-Val-ONp) sont hydrolysés faiblement par C_4 et CT_2 alors que le dérivé aromatique l'est activement. On remarque que pour ces deux types de substrats, il n'y a pas de différence importante d'activité entre C_4 et CT_2. La protéase T n'hydrolyse aucun dérivé d'acide aminé aliphatique et seulement faiblement le dérivé d'acide aminé aromatique, ce qui est un peu surprenant. Le seul dérivé d'acide aminé basique commercialisé (Z-L-Lys-ONp) n'a pas pu être testé car dans les conditions de l'essai, l'hydrolyse spontanée était trop rapide. Le dérivé de la proline n'est hydrolysé par aucune des 3 enzymes. C et CT sont donc spécifiques en priorité des acides aminés aromatiques et accessoirement des aliphatiques. Il faut noter que l'activité observée avec le Z-L-Ala-ONp est au moins dix fois plus faible que celle que donnerait une élastase typique comme celle du pancréas de porc (SHOTTON, 1970).

Une éventuelle activité exopeptidasique a également été testée sur ces trois enzymes (T_1, C_4, CT_2) avec divers substrats (1 mM/l de substrat avec

une concentration finale d'enzyme de 10 à 15 nanoM/l). Ni l'hippuryl-L-arginine substrat de la carboxypeptidase B (WOLFF *et al.*1962) ni l'hippuryl-L-phénylalanine, substrat de la carboxypeptidase A (FOLK *et al.* 1963) ne sont hydrolysés. De même, aucun substrat des divers types d'aminopeptidases : L-leucine-β-naphthylamide, L-tyrosine-β-naphthylamide, L-arginine-β-naphthyl amide, n'est hydrolysé.

La spécificité peut également être précisée par l'emploi d'inhibiteurs réversibles microbiens qui ont une structure de tripeptides mais avec un certain nombre de modifications chimiques, notamment un groupe aldéhyde c-terminal, qui empêchent leur hydrolyse (UMEZAWA, 1972).

Le tableau VIII montre que la protéase T, comme la trypsine de boeuf, est inhibée par la leupeptine et l'antipaine dont le résidu c-terminal est un argininal alors qu'elle n'est pas significativement inhibée par la chymostatine dont le résidu c-terminal est un phénylalaninal. Toutes les autres enzymes sont par contre fortement inhibées par la chymostatine qui est spécifique de la chymotrypsine. La protéase C_4 se distingue des autres par son peu d'affinité pour la leupeptine alors que les protéases C_2 et C_3 lui sont

TABLEAU VII - Hydrolyse d'esters de divers acides aminés par les protéases

Substrats	Activité spécifique *		
	T	C_4	CT_2
Z-Gly-ONp	0	55	16
Z-L-Ala-ONp	0	146	147
Z-L-Val-ONp	0	13	21
Z-L-Tyr-ONp	243	5.300	6.600
Z-L-Pro-ONp	0	0	0

* µM de substrats hydrolysés par min et par mole de protéase dans les conditions de l'essai.

aussi sensibles que les protéases de type CT. Ceci s'explique sans doute par le fait que l'argininal est le seul résidu basique de la leupeptine qui comporte par ailleurs deux résidus aliphatiques (leucine) qui lui donnent un caractère hydrophobe. Par contre, l'antipaine, très inhibitrice pour la papaine et la trypsine, n'est notablement inhibitrice que pour les protéases CT, suffisamment peu spécifiques pour s'accomoder de son deuxième résidu arginine. Il faut toutefois remarquer que cette inhibition des protéases CT par l'antipaine est bien plus faible que celle subie par la protéase T, ce qui confirme la prédominance de leur caractère chymotrypsique.

TABLEAU VIII - Action des inhibiteurs microbiens sur les protéases

Inhibiteur	% d'activité résiduelle * en présence de 0,1°/₀₀ d'inhibiteur								
	T	C_4	C_3	C_2	C_1	CT_1	CT_2	CT_3	CT_δ
Chymostatine	95%	0,5%	3,0%	2,6%	2,6%	1,7%	1,1%	1,0%	0,4%
Leupeptine	0%	76%	11%	7,0%	6,4%	3,3%	2,3%	3,7%	9,5%
Antipaine	0%	92%	97%	98%	79%	28%	43%	38%	79%

Activités mesurées vis-à-vis du TAME pour T, du GGPNA pour les autres

Conclusion

Les principales caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques des enzymes purifiées (récapitulées dans le tableau IX) permettent de les répartir en plusieurs catégories.

D'abord, une enzyme typiquement trypsique par ses caractères enzymatiques, la protéase T, mais qui diffère de celle de boeuf par ses caractéristiques physico-chimiques : poids moléculaire plus élevé, dénaturation en milieu acide et surtout point isoélectrique très acide. En fait, ces caractères varient largement, même à l'intérieur d'un groupe systématique restreint comme les Mammifères (NEURATH *et al.* 1967) et les Etoiles de mer (RUSSO *et al.* 1978) où on trouve tantôt des trypsines basiques stables à pH acide, tantôt des trypsines acides instables en milieu acide. Des activités trypsiques ont par ailleurs été signalées chez divers Annélides polychètes (MICHEL *et al.* 1978, 1979) et, chez *Nereis brandti*, il s'agit aussi d'une protéine acide (DE VILLEZ *et al.* 1971).

La protéase C_4 est, elle, une chymotrypsine typique, puisqu'elle ne diffère de l'α-chymotrypsine de boeuf que par son point isoélectrique, son poids moléculaire et son instabilité en milieu acide. Comme pour la trypsine, ce genre de variation semble courant (BENDER *et al.* 1973) et des enzymes de ce type ont été détectées chez deux autres Annélides polychètes : *Aphrodite* (De VILLEZ, 1972) et *Glycera* (MICHEL *et al.* 1975).

Les protéases C_2 et C_3 sont également typiquement chymotrypsiques mais elles présentent un certain nombre de différences quantitatives avec la protéase C_4 :

- poids moléculaire plus faible;
- moindre sensibilité au TPCK et ZPCK;
- spécificité de substrat moins stricte se traduisant par une activité TAME plus forte, une hydrolyse plus rapide du HPA et une inhibition importante par la leupeptine.

Toutes les autres protéases sont peu spécifiques puisqu'elles ont sensiblement la même activité vis-à-vis du TAME que du BTEE et doivent être divisées en deux groupes au moins. La protéase CTδ se distingue en effet des autres par son activité estérolytique nettement plus faible, l'absence d'effet activateur du PCMB et une sensibilité moindre au TPCK et ZPCK. Parmi les autres, celles qui ont été suffisamment étudiées (C_1, CT_1, CT_2, CT_3) ont

TABLEAU IX - Tableau comparatif des enzymes de *Sabellaria* et des enzymes de boeuf

Enzyme		T	C_4	C_3	C_2	C_1	C_α	CT_α	CT_1	CT_2	CT_3	CT_δ	Trypsine	α chymo-trypsine
Quantité purifiée (mg)		36	9,4	2,0	2,4	1,5	0,9	1,1	12,8	12,8	8,3	5,3		
Point isoélectrique		<3	<3,3	<3,3	3,5	4,0	4,2		6,8	8,3	≥ 9,1	≥ 10	10,8	8,1
Poids moléculaire (kilodaltons)		35,6	32,1	26,5	26,6	28,6	29,8		27,2	26,7	26,8	27,0	24	25
Unités TAME µM		3,3	0,003	0,007	0,008	0,44	0,27	0,37	0,39	0,53	0,70	0,13	8,2	≅ 0
Unités BTEE µM		0	0,83	0,39	0,39	0,44	0,30	0,49	0,54	0,35	0,46	0,15	≅ 0	1,0
Unités HPA µM		1,5	0,57	1,2	1,2	3,7	17	2,1	1,7	2,0	3,2	2,6	4,3	0,28
Activité résiduelle par rapport aux témoins Ca 10 mM	Ca1mM	74%	90%	109%	97%	98%			96%	100%	97%	104%		
	Ca 0	68%	93%	112%	119%	98%			97%	97%	97%	101%		
	EDTA	67%	94%	109%	117%	98%			98%	96%	102%	100%		
	PCMB	98%	82%	98%	95%	142%			147%	149%	138%	101%		
Activité résiduelle après traitement avec :	PMSF	97%	0,1%	1,8%	2,7%	14%			11%	16%	23%	11%	87%	0,1%
	TLCK	<0,1%	100%	93%	93%	100%			103%	99%	106%	96%	77%	100%
	TPCK	100%	13%	82%	80%	37%			44%	48%	46%	65%	100%	79%
	ZPCK	100%	<0,1%	71%	72%	27%			30%	32%	34%	48%	100%	13%
	Chymo-statine	95%	0,5%	3,0%	2,6%	2,6%			1,7%	1,1%	1,0%	0,4%		
	Leupeptine	0%	76%	11%	7,0%	6,4%			3,3%	2,3%	3,7%	9,5%		
	Antipaine	0%	92%	97%	98%	79%			28%	43%	38%	79%		

des caractéristiques suffisamment similaires, notamment l'activation par le PCMB, pour considérer qu'elles font partie du même groupe. Ces enzymes qui ont des caractéristiques chymotrypsiques dominantes, ne semblent pas avoir été décrites chez d'autres espèces animales. Les seules enzymes connues leur ressemblant sont les subtilisines bactériennes (OTTESEN *et al.* 1970), toutefois elles en diffèrent par leur sensibilité au TPCK, alors que les subtilisines ne sont sensibles qu'au ZPCK (SHAW *et al.* 1968).

On ne peut pas exclure l'hypothèse que ces protéases soient en fait fabriquées par la flore bactérienne du tube digestif, mais c'est peu vraisemblable car elles sont présentes en grande quantité et le tube digestif rectiligne de *Sabellaria* semble indiquer un transit intestinal court donc peu favorable à une digestion par bactéries symbiotiques. Aucun cas de production d'une quantité notable de protéase par les microorganismes de la flore intestinale n'a d'ailleurs été décrit chez un organisme marin. Une étude histochimique a montré que les protéases étaient vraisemblablement produites par des cellules séreuses de l'intestin antérieur (MICHEL, 1977).

On trouve donc dans le suc digestif de *Sabellaria* au moins cinq types d'enzymes. Il est possible que diverses enzymes d'une même classe soient des isoenzymes, mais il est improbable que les diverses classes soient des isoenzymes d'un type unique.

3ème PARTIE

FACTEURS DECLENCHANT LA LEVEE DU BLOCAGE PROPHASIQUE

Les protéases capables de déclencher la maturation des ovocytes ont donc été purifiées mais il reste à savoir comment elles interviennent et si elles agissent réellement dans les conditions naturelles. Ce dernier point est particulièrement délicat car il est fréquent que les annélides sédentaires pondent, à la suite de leur récolte, des ovocytes à un stade différent de celui de la ponte physiologique. Ainsi, plusieurs cirratulidés peuvent pondre des ovocytes en prophase I alors que normalement ils passent en métaphase I avant d'être pondus (GIBBS, 1971). De même dans certaines espèces comme *Pectinaria* et *Chaetopterus*, la maturation se fait normalement au contact de l'eau de mer, mais elle peut facilement être inhibée par les perturbations minimes comme la ponte en milieu confiné (HYLANDER *et al.* 1981) ou en eau de mer artificielle (IKEGAMI *et al.* 1975). La relation entre "maturation spontanée" et présence de protéases dans l'eau de ponte doit donc être examinée.

L'étude des conditions d'action des protéases (durée, concentration) est également nécessaire pour déterminer si elles ont la possibilité d'intervenir dans les conditions naturelles. Enfin, la polyspermie est un bon indice de situation non physiologique puisque chez l'étoile de mer ou *Pectinaria* le processus de blocage de la polyspermie n'est mis en place qu'après la réinitiation de la méiose (CAYER *et al.* 1975; HYLANDER *et al.* 1981).

Matériel et Méthodes

Les ovocytes sont préparés selon le processus décrit dans la première partie et les activités biologiques mesurées comme décrit dans la deuxième partie. Pour celles-ci on tire parti de la relation log-normale entre le pourcentage de maturation et la concentration d'enzyme (voir 1°, fig. 15) pour l'interpolation de la dose seuil. En effet, en adoptant une échelle gaussienne pour les pourcentages de maturation et une échelle logarithmique pour les concentrations d'enzyme correspondantes, les valeurs se répartissent selon une droite (droite de Henri). L'interpolation est alors effectuée graphiquement ou par calcul sur une calculatrice HP 41 C.

Le temps minimal d'incubation des ovocytes avec l'enzyme est déterminé par dilution à des temps variables de 0,1 ml de suspension dans 50 ml d'eau de mer, ce qui donne une concentration finale en enzyme 50 fois en dessous du seuil des ovocytes les plus sensibles.

L'activité protéolytique des enzymes est déterminée soit avec le Hide powder azure en eau de mer comme décrit dans la 2ème partie, soit avec la caséine (Merck). Dans ce cas, la digestion est faite dans un tampon Tris 40 mM, $CaCl_2$ 10 mM pH 8,1 selon la méthode de KUNITZ décrite par LASKOWSKI (1955) qui est également adoptée pour le calcul des unités. Dans un cas la membrane vitelline des ovocytes est enlevée par traitement dans de l'eau de mer artificielle sans calcium additionnée de 5 mM/l d'EGTA (acide tétraacétique de l'éther aminoéthylique de l'éthylène glycol) et de 1% de Ficoll (pour limiter l'agglutination des ovocytes) tamponnée à pH 5,5 avec 20 mM/L de MES (acide 2 (n-morpholino) éthanesulfonique). Après trois lavages dans cette solution, les ovocytes sont ensuite rincés dans de l'eau de mer artificielle à pH 5,5 mais avec calcium puis dans l'eau de mer artificielle habituelle à pH 8,0.

Les sucs digestifs bruts de différents annélides sont préparés à partir des tubes digestifs entiers et de leur contenu. Les tubes digestifs prélevés par dissection sont broyés sommairement et congelés avec un peu d'eau de mer artificielle tamponnée à pH 8. Après décongélation, les broyats sont centrifugés 5 minutes à 10.000 g et le surnageant dilué avec de l'eau de mer artificielle.

Les enzymes utilisés proviennent pour la plupart de chez Sigma : trypsine (pancréas de boeuf), type III (tableau XI) et type XI (traitée au diphényl carbamyl chlorure, tableau XII), α-chymotrypsine (pancréas de boeuf) type II, subtilisine Carlsberg (*Bacillus subtilis*) type VIII, subtilisine BPN' (*Bacillus amyloliquefaciens*) type VII, élastase (pancréas de porc) type I, papaïne (latex de papaye) en suspension dans de l'acétate de Na, bromélaïne (ananas) grade II, thrombine (plasma de boeuf) grade III, collagénase (*Clostridium histolyticum*) type I, lysozyme (blanc d'oeuf) grade I, neuraminidase (*Clostridium perfringens*), α-amylase (*Bacillus subtilis*) type II-A et β-galactosidase (foie de boeuf). La pronase (*Streptomyces griseus*) grade B et la phospholipase A (venin d'abeille) grade B sont de Calbiochem. La ther-

molysine (*Bacillus thermoproteolyticus*) et la protéinase K (*Tritirachium album*) sont de Merck. La hyaluronidase (testicule de boeuf) est de Fluka et la Kallikrein ^{R} (pancréas de porc) 1.290 KE/mg est un don gracieux de Bayer AG (dont c'est une marque déposée).

Les essais de détection de protéases spermatiques ont été faits par la technique de digestion de film pour autoradiographie de PENN *et al.* (1972 b) ou par homogénéisation des spermatozoïdes. Dans ce cas, une suspension de spermatozoïdes est d'abord déposée sur une solution de saccharose à 30% dans l'eau de mer puis centrifugée. Le culot de spermatozoïdes est homogénéisé dans 10 volumes de tampon Tris HCl 40 mM/l pH 8.0 contenant 10 mM/l de $CaCl_2$, 0,5°/$_{oo}$ d'hyamine 2389 (BDG) et 0 5°/$_{oo}$ de Triton x 100 (Intertechnique). Après 5 cycles de congélation et décongelation l'homogénat est centrifugé 10 min à 10.000 g et le surnageant testé.

Les inhibiteurs naturels utilisés pour les études de fécondation sont ceux décrits aux 2°, plus : α-1 antitrypsine (homme) (Sigma). Inhibiteur de la trypsine du pancréas de boeuf (Sigma, type I-P), Ovoinhibiteur (poule) (Sigma type IV-O), Inhibiteur de la trypsine des graines de haricot de Lima (LBI) (Worthington), Ovomucoïde (poule) (Sigma type III-o), inhibiteur de la trypsine du blanc d'oeuf de tortue (TTI) (Sigma type II-t). Tous ont été dissous directement dans l'eau de mer artificielle tamponnée, à la concentration de 1°/$_{oo}$.

Relation entre activité protéolytique et déblocage de la méiose

Comme cela a déjà été signalé dans l'introduction de la 2ème partie, lorsque les femelles sont mises à pondre séparément, la fréquence des maturations "spontanées" dépend du soin avec lequel les animaux sont manipulés lors de l'extraction du tube. A chaque fois qu'une blessure est apparente, les ovocytes de la ponte maturent à 100%. De même lorsqu'il y a eu défécation, le taux de maturation est également important. Parmi les femelles apparemment intactes, le pourcentage de maturation dans les pontes est variable d'un lot à l'autre, sans corrélation apparente avec la saison ou l'abondance des ovocytes.

Comme le montre l'expérience correspondant à la figure 14, faite au début de la période de pleine maturité (mai), pratiquement dans toutes les pontes présentant plus de 95% de maturation, l'eau de ponte contient une activité protéolytique suffisamment forte pour être détectable par le BTEE. A l'inverse sur les 29 pontes où l'activité protéolytique n'est pas directement mesurable, seules 3 ont plus de 90% de maturation. La présence de substance induisant la maturation dans l'eau de ces pontes est testée sur un lot témoin d'ovocytes en prophase dont la sensibilité aux enzymes de *Sabellaria* hydrolysant le BTEE est connue. Les résultats obtenus (exprimés en équivalent d'activité BTEE dans la fig. 14), montrent une corrélation avec le pourcentage de maturations "spontanées" observé dans les pontes correspondantes. Le test des rangs de SPEARMAN montre que cette corrélation est significative à 99,7 chances sur 100 ($R = 0,52$; $Z = 2,77$).

Ceci implique que les maturations "spontanées" observées résultent d'une stimulation externe et non de la ponte aléatoire d'ovocytes "mûrs" ou non. L'hypothèse la plus simple est que cette stimulation externe résulte de faibles concentrations de protéases digestives. Ceci est confirmé par le fait que lorsque les pontes ont lieu en présence de SBTI à 1 mg/ml, les maturations "spontanées" deviennent rares et qu'il n'y en a plus à 10 mg/ml. Ce résultat ne peut pas être attribué à une action directe du SBTI sur les ovocytes car d'une part leur maturation peut être déclenchée par fécondation à ces concentrations en inhibiteur et d'autre part ils peuvent être ramenés dans l'eau de mer normale sans réinitier leur méiose.

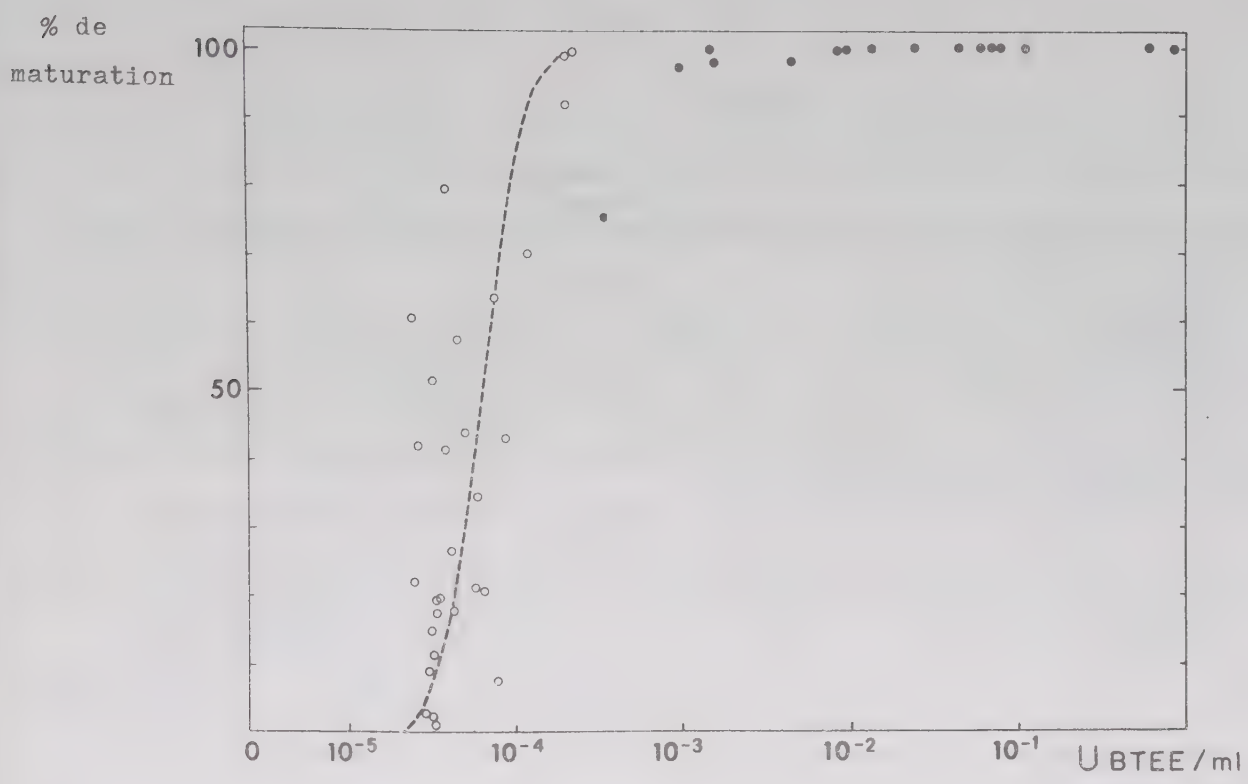


Fig. 14 - Relation entre l'activité protéolytique de l'eau de ponte et le pourcentage de maturation "spontanée".

45 femelles du même bloc sont mises à pondre séparément pendant 20 min dans 1,4 ml d'eau de mer naturelle filtrée sur Millipore. Le pourcentage d'ovocytes maturés dans chaque lot est déterminé 1 h après l'arrêt de la ponte et 1 ml d'eau de mer prélevé et conservé à 4°C. L'activité estérolytique vis-à-vis du BTEE de 0,5 ml de chacun de ces surnageants est ensuite mesurée (•). Dans les lots où l'activité BTEE n'est pas mesurable, les 0,5 ml de surnageant restants sont additionnés de 50 µl d'ovocytes bloqués en propahse, dont la sensibilité à une solution de protéase CT d'activité BTEE connue est simultanément mesurée (-----). Les pourcentages de maturation déterminés 1 h après sont utilisés pour déterminer l'activité biologique des surnageants initiaux, exprimée en unités BTEE (o).

TABLEAU X

Effet des inhibiteurs sur l'activité estérolytique et biologique des protéases de *Sabellaria*.

Les solutions enzymatiques (préparées par filtration sur gel d'acrylamide-agarose) sont incubées 30 min à 20°C avec les inhibiteurs (dans un tampon Tris 50 mM/l, $CaCl_2$ 10 mM/l). Leur activité estérolytique vis-à-vis du BTEE ou du TAME est mesurée, tandis qu'une aliquote est diluée 1.000 x avec de l'eau de mer et conservée à 0°C. L'activité biologique de ces aliquotes est mesurée quelques heures après.

Milieu d'incubation	% d'activité résiduelle		
	TAME	BTEE	Biologique
Fraction T (a)			
TCLK 5×10^{-4} M/l (b)	100%		< 10%
TLCK 5×10^{-5} M/l	< 1%		100%
Fraction C (c)			
TPCK 5×10^{-4} M/l (b)		3,3%	4%
TLCK 5×10^{-5} M/l		100%	100%
Fraction CT (d)			
TPCK 2×10^{-4} M/l (e)	1,7%	0,6%	1%
TLCK 5×10^{-5} M/l	100%	99%	100%

(a) Activités initiales : 11,9 u.TAME/ml; 600 u-biol/ml

(b) Le milieu d'incubation contient également 10% de méthanol et 10% de DMSO.

(c) Activités initiales : 1,8 u-BTEE/ml; 6.900 u-biol/ml

(d) Activités initiales : 3,4 u-TAME/ml; 5 u-BTEE/ml; 25.000 u-biol/ml

(e) Le milieu d'incubation contient également 4% de méthanol et 4% de DMSO.

Il est possible de démontrer à l'aide d'inhibiteurs que c'est bien par leur activité enzymatique que les protéases de *Sabellaria* déclenchent la maturation. La perte d'activité biologique des sucs digestifs en présence d'un excès de SBTI est déjà significative en ce sens mais ce sont les inhibiteurs irréversibles spécifiques (TLCK et TPCK) qui fournissent les résultats les plus convaincants (tableau X). En effet, ces inhibiteurs agissent en ne modifiant qu'un seul acide aminé du site actif donc sans modifier la structure et les capacités d'interactions non enzymatiques de la protéase. On constate que l'activité biologique des fractions C et CT purifiées sur Ultrogel est strictement proportionnelle à l'activité estérolytique, alors que la faible activité biologique de la fraction T est en fait due à un enzyme de type chymotrypsique contaminant . Il a été par ailleurs vérifié qu'aux concentrations utilisées dans les tests biologiques, le TLCK et le TPCK n'ont aucune action inhibitrice sur les ovocytes. La protéolyse d'un constituant de l'ovocyte est donc le stimulus effectif déclenchant la maturation.

La sensibilité des ovocytes à la protéolyse est variable d'un lot d'ovocytes à l'autre et aussi à l'intérieur d'un même lot. La figure 15 montre la répartition des seuils de sensibilité à la protéase CT parmi les ovocytes issus d'une même femelle. Leur distribution coïncide parfaitement avec une loi log-normale, ce qui est souvent le cas en pharmacologie et suggère qu'elle pourrait résulter de petites variations de la taille des ovocytes. D'autres facteurs interviennent sans doute car d'un lot à l'autre, la concentration donnant 50% de maturation varie de 2×10^{-5} à 10^{-4} u BTEE/ml et certains ovocytes maturent à seulement 10^{-5} u BTEE/ml alors que d'autres nécessitent 2×10^{-4} u BTEE/ml. Néanmoins, quelle que soit la saison, il est toujours possible d'obtenir 100% de maturation dans n'importe quelle ponte avec une forte concentration en protéase.

La durée de la maturation dépend aussi de la concentration en protéase, comme le montre la figure 16. Aux fortes concentrations, le stade métaphase I peut être atteint en 25 min, alors qu'à la dose seuil, des ovocytes du même lot mettent 50 min à y arriver. Par contre, le délai entre la rupture de la vésicule germinative et le stade métaphase I est pratiquement constant (15 min) quelle que soit la dose. C'est donc seulement une étape conduisant à la rupture de la vésicule germinative qui est dépendante de la concentration en enzyme.

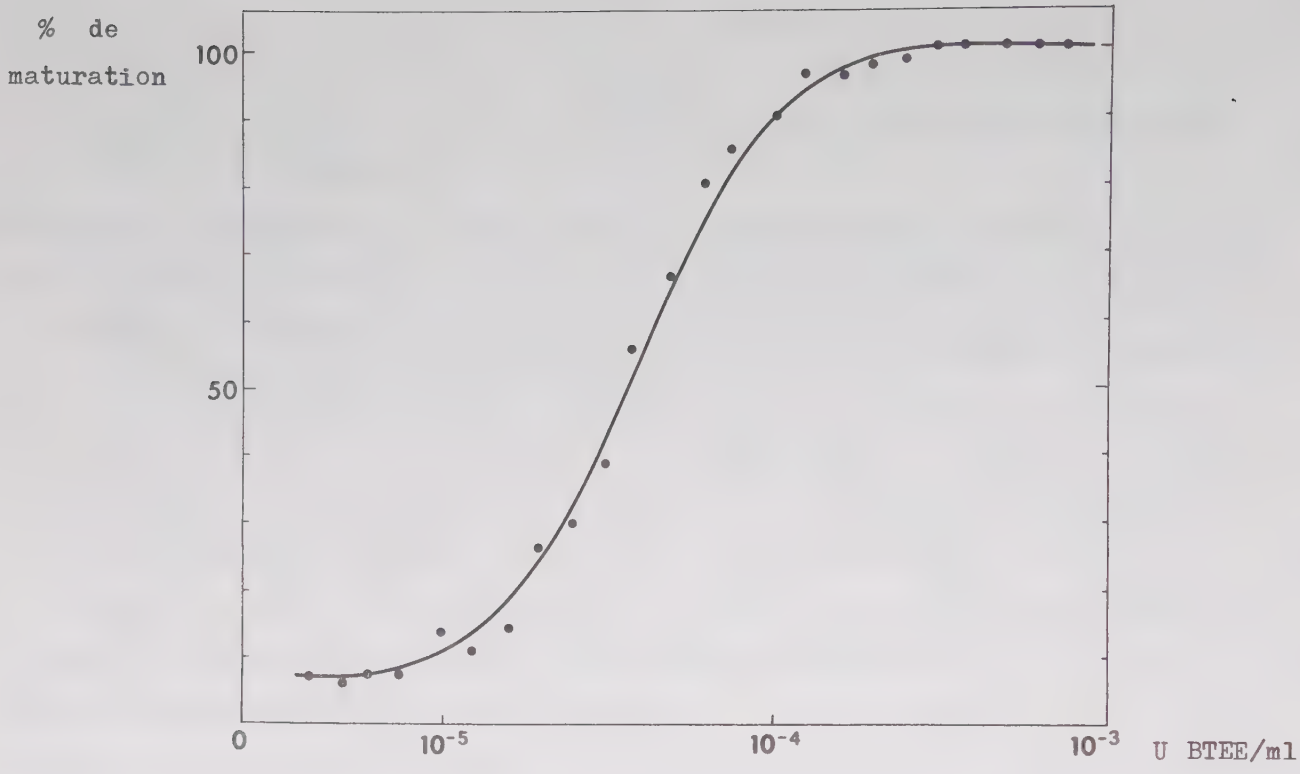


Fig. 15 - Sensibilité des ovocytes d'une même femelle à différentes concentrations de protéase CT.

Des aliquotes de 50 µl de suspension d'ovocyte en prophase sont ajoutées à 1 ml d'eau de mer contenant des concentrations variables de protéase CT (exprimées en u-BTEE/ml). Les pourcentages de maturation (•) sont déterminés 1 h après. La courbe log-normale la mieux ajustée (————) est déterminée sur papier à échelle gaussienne.

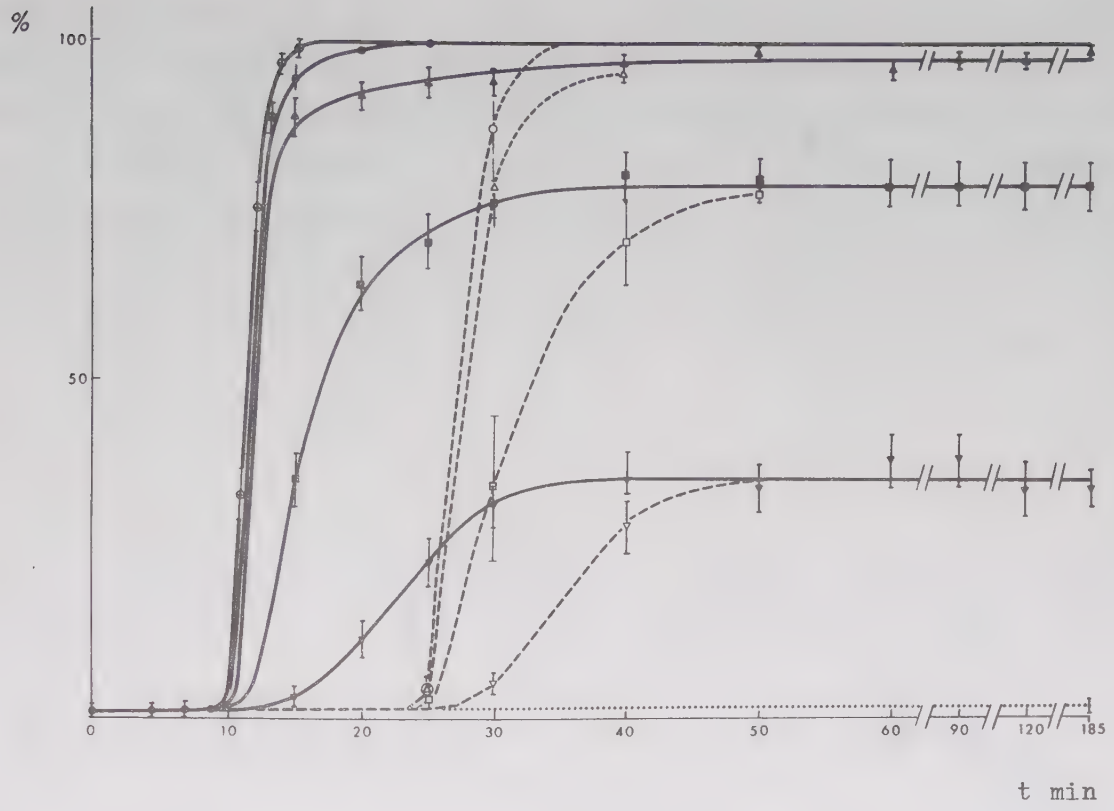


Fig. 16 - Chronologie de la maturation d'un même lot d'ovocyte en présence de diverses concentrations de protéase CT.

A t = 0 les ovocytes sont additionnés de protéase CT aux concentration finales de 2,9 x 10^{-5} (▼); 5,84 x 10^{-5} (■); 1,5 x 10^{-4} (▲); 2,9 x 10^{-4} (●); 5 x 10^{-3} (⊕) u-BTEE/ml, ou en l'absence de protéase (.....). Le pourcentage d'ovocytes dont la vésicule germinative est rompue (symboles noirs) ou ayant atteint le stade métaphase I (symboles blancs) à divers temps est déterminé après fixation et coloration. Les traits verticaux indiquent l'intervalle de confiance à 95 chances sur 100.

Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur le déclenchement par protéolyse de la maturation en variant le temps de contact des ovocytes avec une même concentration d'enzyme. Comme le montre la figure 17, le temps de contact nécessaire varie selon les ovocytes de quelques secondes à 5 min (courbe A), ce qui est beaucoup moins que l'asynchronisme de rupture de la vésicule germinative, qui atteint 15 min (courbe B). Ceci

implique d'une part que la protéolyse qui peut avoir lieu après 5 min dans l'incubation continue (courbe B) est sans effet, et d'autre part que l'asynchronisme de rupture de la vésicule germinative n'est pas seulement dû à la nécessité d'un temps de protéolyse plus long. Le retard à l'entrée en maturation n'est pas non plus une caractéristique intrinsèque de certains ovocyte car la figure 16 montre qu'aux fortes concentrations d'enzyme il n'y a pas plus de 5 minutes de décalage entre les ovocytes les plus sensibles et les moins sensibles.

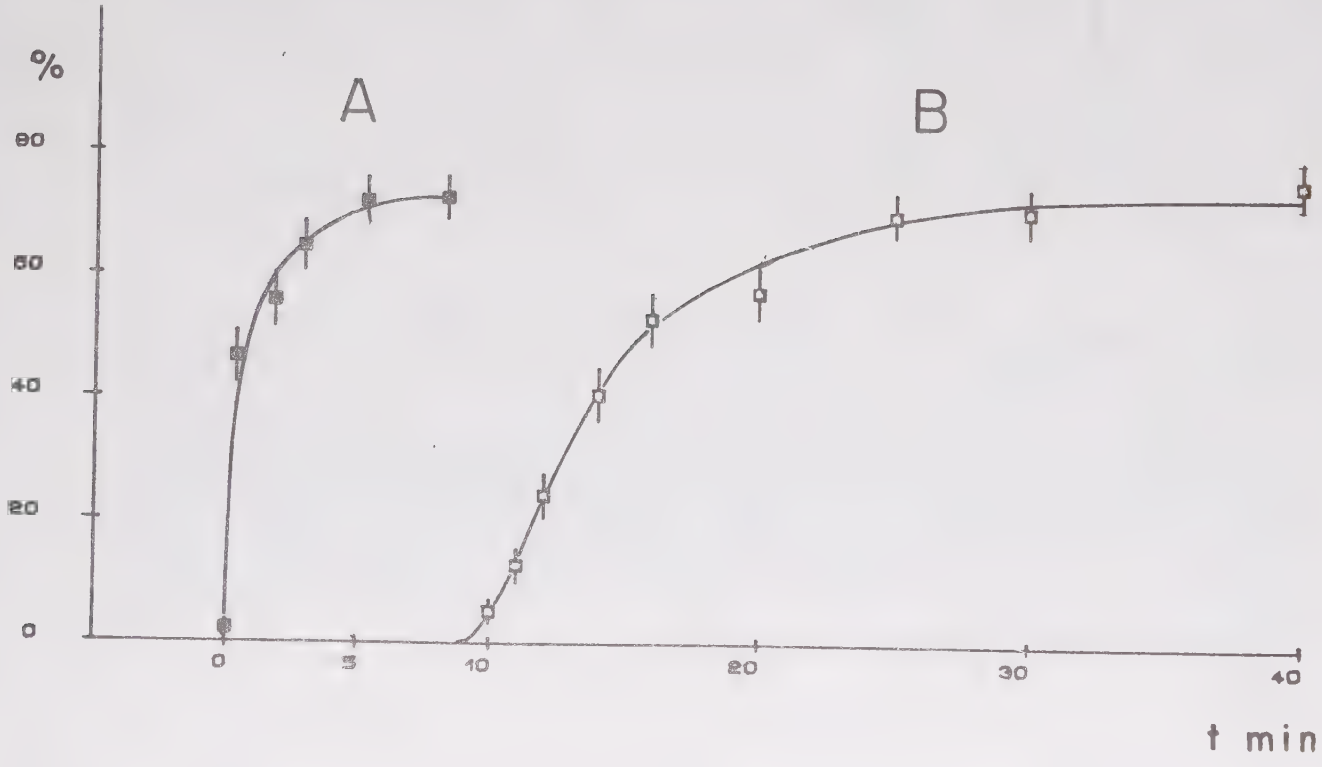
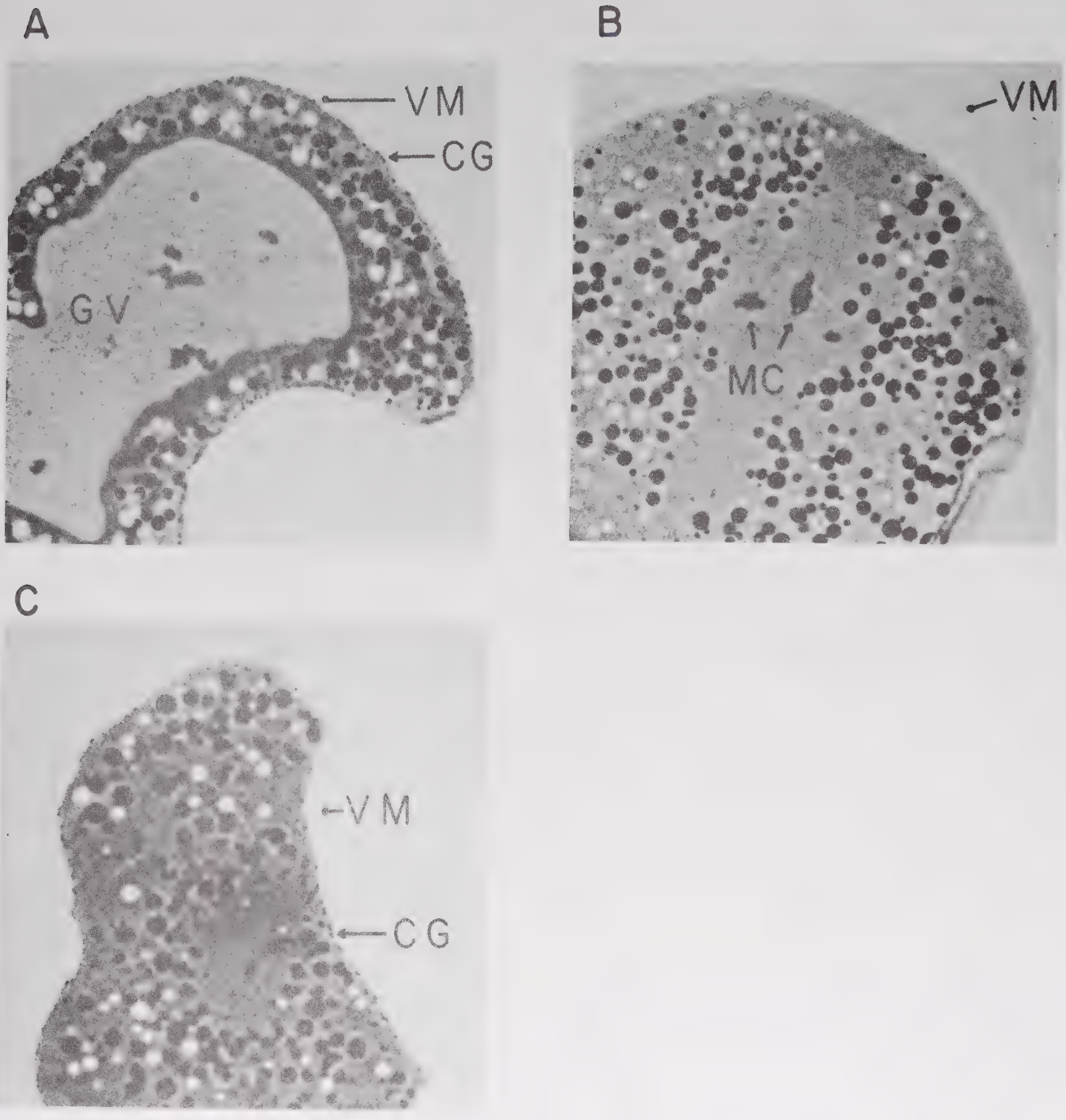


Fig. 17 - Influence du temps d'action des protéases sur la maturation.

A t = 0, une suspension d'ovocytes en prophase est additionnée de protéase CT (10^{-4} u-BTEE/ml final). Une aliquote de 0,1 ml est ensuite prélevée et injectée dans 50 ml d'eau de mer à différents temps (20 s, 1 m 50 s, 3 m, 5 m 20 s, 8 m 20 s) Les pourcentages de maturation de ces échantillons dilués sont déterminés 1 h après (●), tandis que la chronologie de rupture de la vésicule germinative des ovocytes laissés en présence de la protéase est suivie à partir d'échantillons fixés entre 10 et 40 min (○).

Les traits verticaux indiquent l'intervalle de confiance à 95%.



Influence de la concentration en protéase sur la réaction corticale. Coupes semi-fines observées en microscopie optique avec contraste de phase x 1.400.

A - Ovocyte en prophase non traité.

B - Ovocyte normalement maturé sous l'action d'une dose supraliminaire de protéase : réaction corticale normale.

C - Ovocyte maturé sous l'action d'une dose liminaire de protéase : réaction corticale partielle.

GV, vésicule germinative; VM, membrane vitelline; CG, granules corticaux; MC, chromosomes métaphasiques.

On peut donc en conclure que la maturation n'est réinitiée que si un niveau seuil de protéolyse est atteint dans les cinq premières minutes, ce qui suggère que les ovocytes possèdent un mécanisme de réparation. Il est en effet peu plausible que les protéases pénètrent dans les ovocytes, vu leur poids moléculaire, ou qu'elles continuent d'agir après rinçage car elles doivent se détacher du polypeptide hydrolysé pour pouvoir en attaquer un autre. Il apparaît aussi que les effets de la protéolyse initiale sont relayés par un second processus qui se déroule plus ou moins vite selon l'intensité de l'attaque enzymatique et conduit à la rupture de la vésicule germinative, les processus ultérieurs étant, eux, insensibles à l'intensité de la stimulation initiale.

Il faut d'ailleurs noter qu'une stimulation juste liminaire se traduit par une réaction corticale incomplète dans 2 à 4% des ovocytes. Ces ovocytes atteignent le stade métaphase I mais gardent une forme irrégulière et possèdent encore de nombreux granules corticaux intacts (planche XIII).

Relation entre spécificité enzymatique et activité biologique

Des divers constituants membranaires, il semble que seules les protéines contrôlent l'entrée en maturation. En effet, parmi toute une série d'hydrolases purifiées qui ont été essayées sur les ovocytes (à la concentration de 1 g/l), la plupart des protéases déclenchent la maturation. Seules font exception les protéases très spécialisées comme la thrombine, la kallikréine pancréatique et la collagénase. Par contre, ni les glycosidases comme le lysozyme, la neuraminidase, l'hyaluronidase, l'α-amylase et la β-galactosidase, ni la phospholipase A ne sont actives.

Parmi les protéases, les doses seuil pour la réinitiation de la méiose sont très différentes, comme le montre le tableau XI. Les activités biologiques de diverses protéases commerciales et des trois fractions préparées sur Ultrogel y sont comparées ainsi que leur activité protéolytique vis-à-vis d'un substrat non spécifique, la caséine. La différence d'efficacité entre les protéases à activité chymotrypsique de *Sabellaria* et toutes les autres protéases est flagrante, alors que les activités caséinolytiques sont assez voisines. Ainsi, aussi bien les molarités seuil que les rapports entre activités biologiques et activités caséinolytiques montrent une différence d'activité spécifique d'un facteur 1.000 entre les protéases de *Sabellaria* et les plus actives des protéases commerciales.

Il est assez surprenant de constater que pour ces dernières, l'activité biologique est pratiquement indifférente à la catégorie ou à la spécificité enzymatique. Ainsi les protéases à sérine, qu'elles soient de boeuf ou de microorganismes (trypsine, chymotrypsine, subtilisine, protéinase K), ne sont pas plus actives que la papaïne, une protéase à cystéine, et la thermolysine, une métalloprotéinase, est également active, bien qu'à plus forte dose. De même, parmi les protéases à sérine, l'aptitude à hydrolyser les esters d'acides aminés aromatiques ne confère une activité biologique supérieure que pour les protéases de *Sabellaria* et pas pour celles d'autres origines.

TABLEAU XI

Comparaison de l'activité protéolytique et biologique de diverses protéases commerciales et de celles de *Sabellaria*.

Enzyme	U-biol/mg	KU/mg (a)	U-biol/KU	Molarité seuil (b)
Fraction T (c)	< 224	0,461	< 486	$> 1{,}92 \times 10^{-7}$
Fraction C (d)	200.400	3,03	66.200	$2{,}48 \times 10^{-10}$
Fraction CT (d)	345.100	2,23	155.000	$1{,}89 \times 10^{-10}$
Trypsine	99,5	4,49	22,2	$4{,}19 \times 10^{-7}$
α-chymotrypsine	20,9	5,67	3,7	$1{,}91 \times 10^{-7}$
Subtilisine Carlsberg	123	5,11	24,1	$2{,}98 \times 10^{-7}$
Subtilisine BPN'	13	4,73	2,7	$2{,}80 \times 10^{-6}$
Protéinase K	13,8	4,55	3,03	$3{,}92 \times 10^{-6}$
Pronase	6,2	1,68	3,7	-
Thermolysine	1,62	21,1	0,08	$1{,}68 \times 10^{-5}$
Elastase	7,5	4,49	1,67	$5{,}15 \times 10^{-6}$
Papaïne (e)	140	1,85	75,8	$3{,}06 \times 10^{-7}$
Bromélaine (e)	5,22	0,711	7,34	$8{,}71 \times 10^{-6}$

(a) Activité protéolytique vis-à-vis de la caseine exprimée en unités de Kunitz (KU).

(b) Concentration déclenchant 50% de maturation (= 1 U-biol/ml). Plusieurs lots d'ovocytes ont été utilisés mais toutes les activités biologiques ont été corrigées pour correspondre au premier lot utilisé.

(c) Fraction T traitée au TPCK. Les calculs sont basés sur la concentration en protéine (méthode de Lowry), en supposant négligeables les contaminations.

(d) Calculs basés sur la titration des sites actifs par le NCDC.

(e) L'enzyme est dissous en présence de cystéine (0,1 M/l), EDTA (20 mM/l), Tris (8 mM/l, pH 8)et dilué pour les tests biologiques, avec de l'eau de mer contenant 5 mM/l de cystéine et 1 mM/l d'EDTA.

TABLEAU XII

Activité protéolytique et biologique des protéases purifiées de *Sabellaria* et de la trypsine et α-chymotrypsine de boeuf.

Les concentrations seuil sont exprimées en nanomole d'enzyme actif par litre (d'après titration des sites actifs) et en activité protéolytique par litre (vis-à-vis du hide powder azure). Les activités biologiques sont standardisées entr'elles mais pas avec celles du tableau XI.

Protéase	Concentration seuil		Protéase	Concentration seuil	
	Nano M/l	u HPA/l		Nano M/l	u HPA/l
T	50	76	C_1	0,35	1,3
Trypsine	88	380	C_α	0,28	4,7
C_4	0,34	0,19	CT_α	0,41	0,87
α-chymo	595	167	CT_1	0,41	0,71
C_3	0,78	0,96	CT_2	0,22	0,44
C_2	0,86	1,0	CT_3	0,21	0,67
			CT_δ	0,26	0,67

L'activité biologique des protéases de *Sabellaria* purifiées est assez homogène, comme le montre le tableau XII, à l'exception de la protéase T, qui n'est guère plus efficace que son analogue, la trypsine de boeuf. Les concentrations seuil sont toutes comprises entre 2 et 4 x 10^{-10} M/l, seules les protéases du groupe C_2-C_3 sont moins actives. De même le rapport entre l'activité biologique et l'activité protéolytique des protéases de type C ou CT varie assez peu. Seule la valeur de la protéase C_α est notablement différente mais sujette à caution pour les raisons exposées dans la 2ème partie. Il ne faut pas trop s'étonner des différences entre certaines valeurs du tableau XII et du tableau XI, notamment celles se rapportant à la trypsine et à l'α-chymotrypsine de boeuf. En effet, les préparations commerciales utilisées sont différentes et pour le tableau XI les concentrations en site actif n'ont pas été vérifiées comme pour le tableau XII. D'autre part, les activités biologiques ont été mesurées sur des lots d'ovocytes différents et ont été standardisées à l'intérieur de chaque tableau avec une solution de référence mais pas entre les deux tableaux.

Il y a donc un écart considérable entre l'activité biologique des protéases de *Sabellaria* à activité chymotrypsique d'une part et les protéases commerciales ainsi que la protéase T d'autre part. Cette différence d'activité spécifique ne peut être attribuée à une meilleure adaptation à la protéolyse en milieu marin car les tests d'activité sur le Hide powder azure ont été faits dans l'eau de mer pour tous les enzymes.

Parmi les protéases très actives de *Sabellaria*, il est surprenant de constater qu'il n'y a aucune relation apparente entre les caractéristiques physico-chimiques et l'aptitude à réinitier la méiose, contrairement à ce qu'avaient laissé espérer les premiers résultats avec les fractions partiellement purifiées.

Il ne semble pas non plus que l'activité biologique soit liée à une aptitude particulière à traverser la membrane vitelline des ovocytes. Comme le montre la figure 18, les concentrations seuil en protéase CT_1 et en trypsine de boeuf ne sont en effet pas modifiées par l'élimination préalable de la membrane vitelline. Ceci confirme également que c'est bien la membrane cytoplasmique des ovocytes qui est la cible des protéases.

Si toutes les protéases à activité chymotrypsique de *Sabellaria* pouvaient être considérées comme des isoenzymes d'un seul type enzymatique, la

similitude de leur activité biologique s'expliquerait aisément. Cependant, l'étude de leurs caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques montre qu'elles appartiennent à au moins trois groupes distincts. Ceci suggère que leur forte activité spécifique pour la réinitiation de la méiose est peut-être liée à une caractéristique courante chez les protéases d'annélides ou de leur flore intestinale, mais absente ou altérée chez les espèces phylogénétiquement éloignées. Cette hypothèse a été testée en comparant l'activité biologique et protéolytique de sucs et d'extraits digestifs bruts de quelques polychètes. Comme le montre le tableau XIII, les extraits de toutes les espèces sont capables d'initier la méiose mais seuls ceux du genre *Sabellaria* possèdent un rapport entre activité biologique et activité protéolytique supérieure à 1.000. Chez le Spirographe et le *Nephthys*, ce rapport a une valeur intermédiaire alors que chez les autres espèces, il est inférieur ou égal à celui des enzymes de boeuf. On remarque qu'il n'existe aucune correlation entre l'activité biologique des extraits digestifs d'une espèce et la ressemblance des modes de vie, qui est par exemple très forte

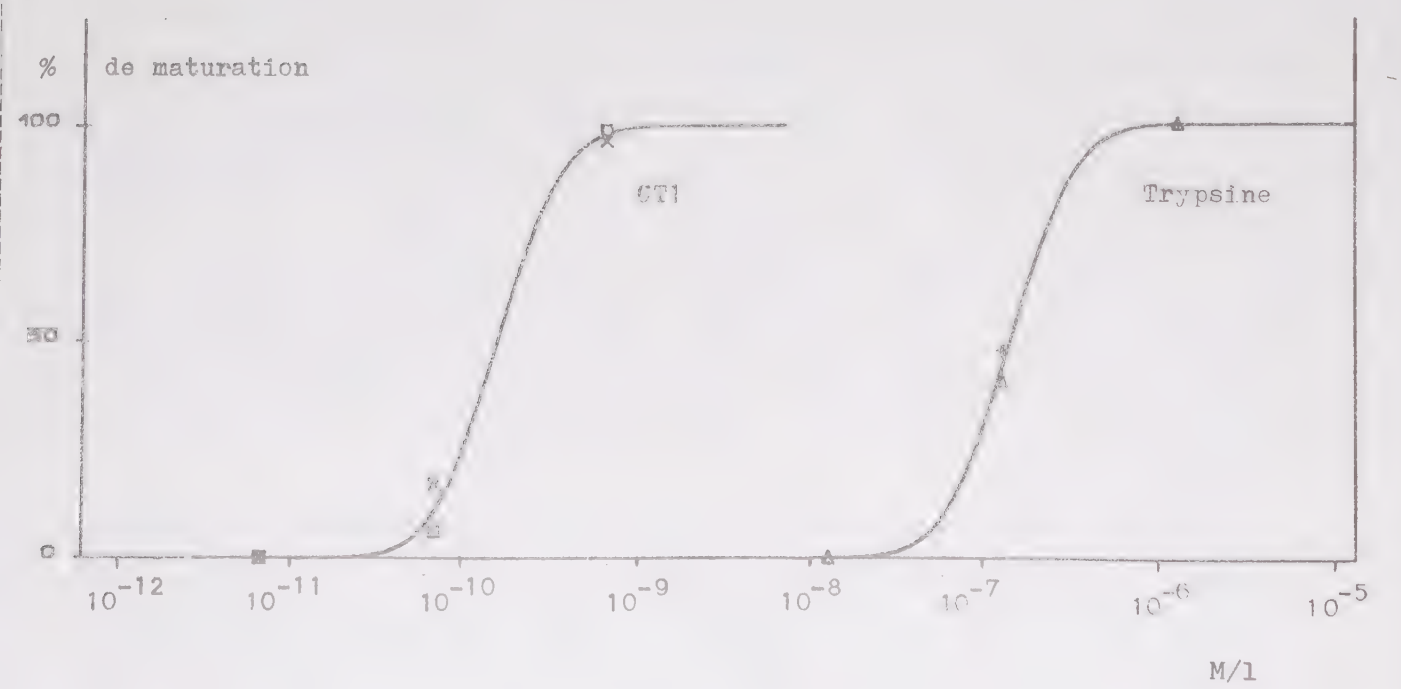


Fig. 18 - Déclenchement de la maturation d'ovocytes avec ou sans membrane vitelline par la protéase CT_1 et la trypsine de boeuf.

Le pourcentage de maturation d'un même lot d'ovocytes avec ou sans membrane vitelline est déterminé après 1 h d'incubation en présence de plusieurs concentrations de protéase CT_1 (O, ovocytes avec MV; X, ovocytes sans MV) ou de Trypsine (Δ, ovocytes avec MV; +; ovocytes sans MV).

pour *Pectinaria* et nulle pour le *Nephthys*, qui est un polychète errant. Il n'existe pas non plus de correlation évidente avec le régime alimentaire car celui de *Sabellaria* est intermédiaire entre celui de *Pectinaria*, fortement psammivore et celui du Spirographe, typiquement filtreur, tandis que les autres sont macrophages. C'est également un argument supplémentaire pour rejeter l'hypothèse que les protéases sont produites par des microorganismes de la flore intestinale.

TABLEAU XIII

Détermination de l'activité protéolytique et biologique d'extraits bruts de protéases digestives de divers annélides polychètes.

L'activité biologique de chaque extrait est mesurée ainsi que son activité protéolytique vis-à-vis du Hide powder azure (en eau de mer). Les résultats indiqués pour chaque extrait sont le rapport entre l'activité biologique et l'activité protéolytique ainsi que l'activité protéolytique de la dilution d'extrait déclenchant 50% de maturation (D 50). Les valeurs obtenues avec des protéases purifiées sont rappelées pour comparaison mais les activités biologiques ne sont pas standardisées entre les deux parties du tableau, ni avec les autres tableaux.

Extrait	u-biol/u-HPA	D 50 (u-HPA/l)
Sabellaria alveolata	1.481	0,675
Sabellaria spinulosa	1.136	0,880
Pectinaria koreni	0,35	2.840
Spirographis spallanzani	217	4,61
Glycera convoluta	1,19	844
Nephthys hombergii	84,2	11,9
Perinereis cultrifera	1,36	736
C_4	5.160	
C_2	969	
Trypsine	2,64	
α-chymotrypsine	6,00	

Il existe donc une spécificité indubitable de certaines protéases pour la réinitiation de la méiose, mais elle n'est pas l'apanage d'un seul type enzymatique contrairement aux autres cas connus de forte spécificité (voir HOLZER *et al.* 1980). Par contre, ce type de spécificité n'est pratiquement pas répandu en dehors du genre *Sabellaria* puisque seules des protéases de certains polychètes comme *Spirographis* ou *Nephthys* semblent l'avoir à un moindre degré. L'expérience sommaire qui le montre ne permet d'ailleurs pas de dire si parmi les protéases des sucs digestifs de *Spirographis* ou *Nephthys* plusieurs présentent une spécificité moyenne ou une seule une spécificité aussi forte que chez *Sabellaria*.

Relation entre maturation et fécondation

Le processus par lequel la maturation est déclenchée dans les conditions expérimentales ne fait pas de doute : les maturations qualifiées de spontanées par les auteurs précédents sont en fait déclenchées par les protéases digestives de la mère qui contaminent l'eau de ponte. On peut toutefois s'interroger sur le mécanisme qui intervient lors de la ponte dans les conditions naturelles. En effet, puisque la maturation n'est pas spontanée, les ovocytes doivent rester en prophase jusqu'à la fécondation, mais alors on s'explique mal la spécificité des protéases digestives et le blocage suivant en métaphase I.

En été, il n'est pas rare que les animaux pondent "spontanément" lorsque les blocs ramenés au laboratoire sont mis en aquarium. Il est toutefois difficile de savoir si les ovocytes ainsi pondus maturent "spontanément" ou non car il y a toujours émission simultanée de sperme par les mâles voisins si bien que tous les ovocytes sont fécondés et même ceux qui restent bloqués en métaphase I présentent des spermatozoïdes partiellement entrés. Une seule ponte (sur 7) prélevée dans ces conditions contenait un pourcentage notable d'ovocytes bloqués en prophase mais ces ovocytes étaient probablement anormaux car ils possédaient tous 2 nucléoles. Ce sont donc plutôt des arguments indirects qu'il faut chercher.

Il semble tout à fait possible que les protéases digestives interviennent dans les conditions naturelles vu leur très forte activité spécifique. On peut en effet estimer que les sucs digestifs contiennent 14 mg/ml de protéase de type CT, 4 à 6 mg/ml de type C et 2 à 3 mg/ml de T. L'activité biologique du suc digestif brut est donc due pour 75 à 85% aux protéases de type CT et pour 15 à 25% à celle de type C. Le volume moyen de suc digestif récupérable par ponction est d'environ 5 µl par animal. Un adulte contient donc suffisamment de protéases pour déclencher la maturation des ovocytes dans 10 à 30 litres d'eau de mer. Il est donc envisageable, bien que cela n'ait pas pu être vérifié expérimentalement, que par simple défécation, la concentration en protéase au niveau du tube soit suffisante pour déclencher la maturation.

La comparaison de la fécondabilité des ovocytes en prophase et en métaphase est également susceptible de fournir des indications sur le processus naturel. En effet, si les protéases interviennent dans les conditions nautrelles, on doit s'attendre à ce que les ovocytes maturés soient plus facilement fécondés. Or, il n'en est rien, comme le montre la figure 19 : les ovocytes en prophase sont fécondables à des concentrations en spermatozoïdes 1.000 fois plus faibles que en ovocytes en métaphase I. De plus, la fécondation des ovocytes en prophase n'est pas perturbée par une agitation modérée alors que celle des ovocytes maturés est presque totalement inhibée. Il faut également remarquer que les concentrations en spermatozoïdes nécessaires pour la fécondation chez *Sabellaria* sont très supérieures à celles d'autres espèces. Ainsi chez l'étoile de mer comme chez l'oursin, on obtient

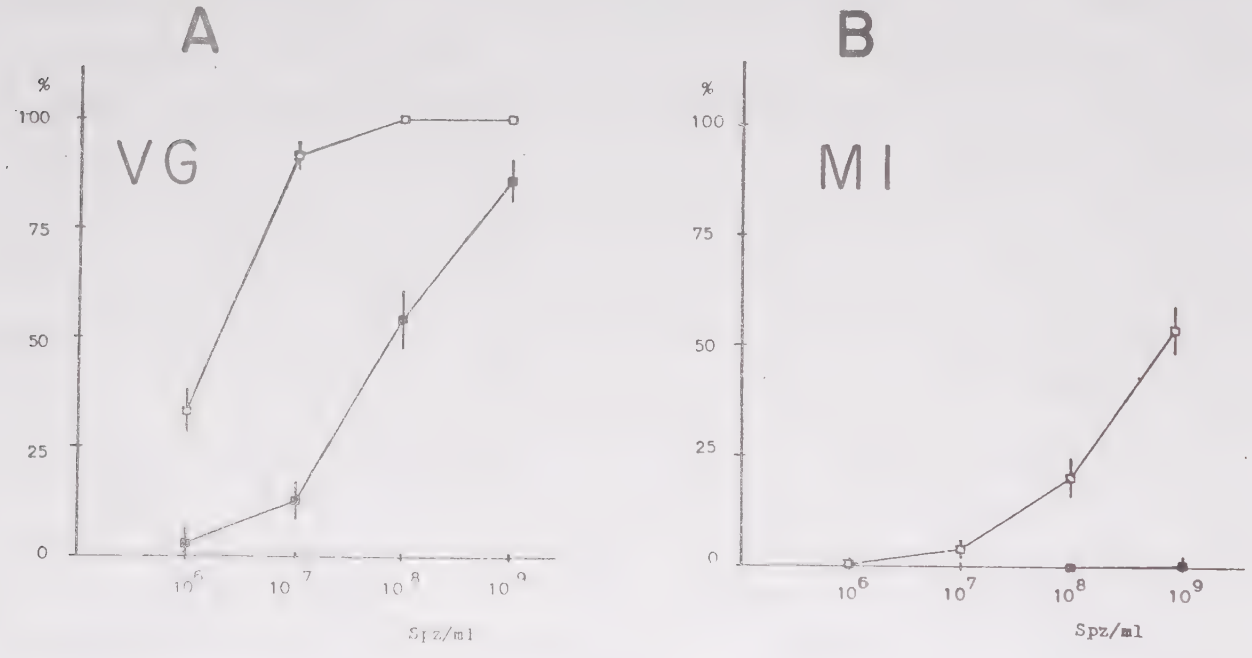


Fig. 19 - Taux de fécondation et de polyspermie d'ovocytes additionnés de diverses concentrations de spermatozoïdes avant ou après maturation.

A - Des ovocytes en prophase sont mis en contact pendant 15 min avec différentes concentrations de spermatozoïdes lavés. Le pourcentage de fécondation (O) et de polyspermie parmi les fécondés (●) est déterminé 50 min après l'addition de spermatozoïdes.

B - Plusieurs femelles sont mises à pondre ensemble dans de l'eau de mer normale. Les ovocytes bloqués en métaphase I sont lavés puis additionnés de spermatozoïdes à diverses concentrations (50 min après la ponte) pendant 30 min. Le pourcentage de fécondation (O) et de polyspermie (●) est déterminé 45 min après l'addition des spermatozoïdes.

Les traits verticaux indiquent l'intervalle de confiance à 95% des comptages.

couramment 100% de fécondation avec seulement 10^5 spermatozoïdes par ml (FUJIMORI *et al.* 1979; DE FELICE *et al.* 1979). Ceci suggère que dans les conditions naturelles, la fécondation a de meilleures chances de réussite avec les ovocytes en prophase qu'avec les maturés. D'ailleurs 10^8 spermatozoïdes par ml semble être la concentration maximale de spermatozoïdes qui puisse être atteinte à l'orifice des tubes dans la nature. Cependant, la figure 19 montre aussi que les ovocytes en prophase sont très facilement polyspermiques. Ainsi à 10^7 spermatozoïdes par ml on compte parmi les 92% d'ovocytes fécondés 13% de polyspermiques alors que chez l'étoile de mer ou l'oursin on n'observe un taux de polyspermie supérieur à 10% que pour des concentrations 100 fois supérieures à celles nécessaires pour obtenir 100% de fécondation (FUJIMORI *et al.* 1979; DE FELICE *et al.* 1979). Il semble donc que le mécanisme de blocage de la polyspermie soit très peu performant, voire même inexistant chez les ovocytes en prophase. Ceci est d'autant plus surprenant que la fécondation en prophase déclenche une réaction corticale similaire à celle des ovocytes d'échinodermes où elle joue un rôle primordial dans le contrôle de la polyspermie (EPEL, 1975).

La facilité avec laquelle la maturation est initiée par les protéases pourrait s'expliquer par la présence de protéases similaires dans l'acrosome des spermatozoïdes. Tous les essais de mise en évidence d'une "acrosine" dans les spermatozoïdes de *Sabellaria* ont malheureusement été infructueux. La technique de PENN *et al.* (1972b) qui permet une détection aisée des acrosines de mammifères et de batraciens (PENN *et al.* 1972a) par la réalisation d'un frottis de spermatozoïdes sur du film pour autoradiographie ne révèle aucune digestion significative de la gélatine par les spermatozoïdes de *Sabellaria*, même après plusieurs heures d'incubation en chambre humide. De même le surnageant d'un homogénat de spermatozoïdes (10% vol/vol) préparé en présence de détergents est inactif lorsqu'il est dilué 100 fois avec une suspension d'ovocytes en prophase (avec des concentrations supérieures, les détergents seuls suffisent à déclencher la maturation). Avec les spermatozoïdes de mammifères, par contre, les détergents solubilisent tous les enzymes acrosomiens (Mc RORIE *et al.* 1974).

Un autre argument en faveur de l'absence d'enzymes protéolytiques dans l'acrosome des spermatozoïdes est fourni par la fécondation d'ovocytes en prophase en présence d'inhibiteurs de protéases. Sept inhibiteurs naturels

connus pour inhiber les divers types de protéases (VOGEL *et al.* 1968) s'avèrent sans action sur la fécondation comme le montrent les résultats du tableau XIV. Dans cette expérience, la concentration en spermatozoïdes a été choisie suffisamment faible (10^7 spermatozoïdes/ml) pour que même une faible inhibition ait pu être détectée. Dans les mêmes conditions, la fécondation est inhibée *in vitro* chez le lapin à 90 % par le SBTI et à 36 % par l'ovomucoïde (STAMBAUGH *et al.* 1969). De même, les inhibiteurs d'origine microbienne n'ont aucune action sur la fécondation (tableau XV). Les mêmes doses d'inhibiteur sont pourtant capables d'inhiber à plus de 90% les protéases de *Sabellaria* (voir tableau IX), et de réduire d'un facteur 5 le taux de fécondation chez l'oursin dans le cas de la chymostatine (HOSHI *et al.* 1979). Il est à remarquer qu'au contraire, la chymostatine seule déclenche un fort pourcentage de maturation. Ceci est probablement en rapport avec sa structure chimique qui lui confère des propriétés de détergent (GLABE *et al.* 1980). Néanmoins les ovocytes maturés pendant le prétraitement, tout comme ceux restés en prophase sont fécondables et donnent des larves nageuses. Par ailleurs, ni les inhibiteurs naturels ni ceux d'origine microbienne n'affectent

TABLEAU XIV

Effet de divers inhibiteurs naturels des protéases sur la fécondation.

Les inhibiteurs (1 g/l final) sont ajoutés aux ovocytes en prophase 5 min avant l'addition de spermatozoïdes lavés (10^6/ml final). Les pourcentages de fécondation (± intervalle de confiance à 95%) sont déterminés 1 h après.

Inhibiteur	Fécondation	Inhibiteur	Fécondation
-	56 ± 6%	Ovoinhibiteur	65 ± 7%
SBTI	59 ± 6%	Lima bean inhibiteur	53 ± 7%
α_1-antitrypsine	48 ± 7%	Ovomucoide	58 ± 7%
Antitrypsine pancréatique	64 ± 6%	Inhibiteur de l'oeuf de tortue	75 ± 6%

le soulèvement de la membrane vitelline, contrairement à ce qui se passe chez l'oursin (HOSHI *et al.* 1979). L'absence d'inhibition de la fécondation par les inhibiteurs de protéases ne permet toutefois pas d'exclure catégoriquement la présence d'acrosine spermatique. Chez l'oursin, en effet, une acrosine sensible au SBTI a pu être isolée et purifiée (LEVINE *et al.* 1980) alors que la fécondation n'est pas inhibée en présence de SBTI (HOSHI *et al.* 1979).

TABLEAU XV

Effet de divers inhibiteurs microbiens de protéases sur la maturation et la fécondation.

Les ovocytes en prophase sont additionnés de 1% de DMSO contenant ou non l'inhibiteur (0,1 g/l final). 30 min plus tard, une aliquote est fixée, le reste est additionné de 10 µl de spermatozoïdes (10^8/ml) prétraités depuis 10 min par le même inhibiteur à la même concentration.

Inhibiteur	% de maturation (± int. conf. 95%) après 30 min. de prétraitement	1 heure après fécondation
Témoin (DMSO sans inhibiteur)	3,0 ± 1,5%	42 ± 5%
Chymostatine	78 ± 4%	85 ± 5%
Leupeptine	2,1 + 1,9/- 1,1%	95 ± 2,5% *
Antipaine	1,6 + 1,7/- 0,9%	47 ± 5%

* additionné par erreur de 100 µl de spermatozoïdes (au lieu de 10 µl).

Conclusion

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que lorsque la ponte est déclenchée expérimentalement par extraction des femelles de leur tube, les ovocytes ne maturent pas spontanément au contact de l'eau de mer, si elle n'est pas contaminée par des protéases. Les observations antérieures faites par divers auteurs (FAURE-FREMIET, 1924; HARRIS, 1935) selon lesquelles la ponte est toujours suivie de la maturation, peuvent être attribuées à ce que l'eau de ponte était régulièrement contaminée par des protéases du tube digestif, par suite d'une extraction trop brutale. La libération d'un dix millième du contenu du tube digestif est en effet suffisante pour déclencher la maturation si la ponte est effectuée dans quelques millilitres d'eau de mer. Ceci explique que même quand l'extraction est faite avec soin, on obtienne 100% de maturation dans plus d'un tiers des pontes. ZOTTOLI *et al.* (1974) ont d'ailleurs montré la libération de protéases par divers annélides polychètes tubicoles lorsqu'ils sont extraits de leur tube, alors que les polychètes errantes n'en libèrent pas. Ces auteurs concluent cependant que ces protéases ne proviennent pas du tube digestif mais d'hypothétiques cellules épithéliales et serviraient à maintenir propre l'intérieur du tube. Cette hypothèse n'est cependant pas confirmée par des expériences de détection des protéases sur coupes à congélation de *Sabellaria* à divers niveaux : aucune activité protéolytique n'est discernable au niveau de l'épithélium (sauf une activité douteuse au niveau des branchies) alors qu'il y en a une intense au niveau de l'intestin (MICHEL, 1977 et communication personnelle).

Ce qui se passe dans les conditions naturelles reste, par contre, hypothétique car inaccessible à l'observation directe et de plus les expériences présentées fournissent des arguments contradictoires.

La première possibilité est que les ovocytes restent en prophase I jusqu'à ce qu'ils soient fécondés, soit pendant, soit après leur expulsion du tube par la mère. Le premier argument en faveur de cette hypothèse est que la fécondation apparaît plus facile en prophase I qu'en métaphase I. En effet, chez les espèces où la fécondation a normalement lieu en métaphase I, la fécondation artificielle d'ovocytes en prophase I ne déclenche pas la reprise de la méiose, comme cela a été montré chez l'arénicole

(OKADA, 1941), *Pectinaria* (HYLANDER *et al.* 1981) et plusieurs cirratulidés (GIBBS, 1971). Un autre argument est le rôle digestif indéniable des protéases capables de déclencher la maturation. En effet, les protéases de type C et CT représentent plus de 90% de l'activité protéolytique non spécifique du suc digestif et sont présentes même en dehors de la période de ponte présumée. Il a d'ailleurs été vérifié que ces protéases sont incapables de réinitier la méiose d'ovocytes d'autres espèces telles que l'arénicole (*Arenicola marina*), l'étoile de mer (*Marthasterias glacialis*) et le Xénope (*Xenopus laevis*). Donc dans cette hypothèse le déclenchement de la maturation par protéases ne serait qu'un artifice expérimental comme chez *Urechis* (PAUL, 1975), *Spisula* et *Hydroides* (ASHTON, 1959). La présence d'une forte activité biologique dans 3 des 4 types de protéases digestives serait alors une coïncidence à moins qu'elle ne soit due à une ressemblance avec une acrosine spermatique. Il est vrai que les expériences qui permettent de détecter la présence d'acrosine dans les spermatozoïdes de mammifères donnent des résultats négatifs quand elles sont transposées chez *Sabellaria*. Toutefois, le cas de l'oursin montre qu'un résultat négatif avec ces techniques n'est pas forcément significatif puisqu'une acrosine a pu finalement y être purifiée.

La seconde possibilité est que les protéases digestives soient présentes en quantités suffisantes dans le tube pour que les ovocytes aient déjà commencé leur maturation lorsqu'ils sont expulsés du tube. Cette hypothèse est supportée par la forte tendance à la polyspermie des ovocytes en prophase ce qui est également une caractéristique des ovocytes "immatures" chez l'étoile de mer (CAYER *et al.* 1975) et *Pectinaria* (HYLANDER *et al.* 1981). L'action des protéases aurait donc pour rôle de limiter la polyspermie ce qui expliquerait l'existence d'une spécificité. Cette spécificité différencie en effet les présents résultats des autres cas connus d'activation expérimentale d'ovocytes par protéases qui, eux, exigent de fortes concentrations en enzyme. Ainsi chez *Chaetopterus pergamentaceus*, la maturation des ovocytes (bloqués par l'eau de mer sans calcium) est déclenchée par la trypsine à 0,3% (IKEGAMI *et al.* 1976), les ovocytes d'*Urechis caupo* sont activés par la trypsine à 0,1% (PAUL, 1975), la rupture de la vésicule germinative est également déclenchée chez *Spisula* et *Hydroides* par des doses vraisemblablement similaires de trypsine (ASHTON, 1959

De même, la réaction corticale est déclenchée chez *Pomatoceros triqueter* par la trypsine à 0,1% (MONROY, 1948) chez l'étoile de mer *Patiria miniata* par la pronase à 0,01% (HOUK, 1974) ou chez *Dendraster excentricus* par la trypsine à 3×10^{-5} ou 3×10^{-8}M/l (MOORE, 1951). On pourrait certes envisager que des caractéristiques physico-chimiques particulières aux protéases de *Sabellaria*, comme celles qui entraînent leur rétention sur gel de polyacrylamide-agarose (voir annexe 1), favorisent leur adsorption à la surface des ovocytes, créant une microconcentration locale. Cependant, rien ne soutient cette hypothèse puisque l'enlèvement de la membrane vitelline est sans effet et que la subtilisine Carlsberg, par exemple, qui est autant retardée sur Ultrogel que les protéases CT (annexe 1), n'a pas une activité spécifique plus forte que les protéases de boeuf. Il est donc plus vraisemblable que la forte activité biologique des protéases de *Sabellaria* est due à une activité catalytique élevée vis-à-vis d'une séquence complexe d'acides aminés, avec une conformation particulière, existant sur la protéine membranaire cible. Par ailleurs, sous l'action des protéases, les ovocytes de *Sabellaria* se bloquent toujours à 100% en métaphase I, alors qu'il est rare que les activations parthénogénétiques, comme celles mentionnées plus haut, donnent des effets aussi homogènes et le blocage a généralement lieu après achèvement de la méiose (TYLER, 1941). C'est d'ailleurs ce qui se passe lorsque les ovocytes de *Sabellaria* en prophase sont activés par l'ionophore A 23187 (voir 4ème partie).

On ne peut toutefois exclure une dernière alternative qui serait que pendant une courte période de l'année les ovocytes maturent juste avant la ponte, comme chez l'arénicole (HOWIE, 1961, 1963), *Autolytus* (GIDHOLM, 1965; ALLEN, 1964, 1967), *Pectinaria* (TWEEDELL, 1966) et divers cirratulidés (GIBBS, 1971), confirmant ainsi l'observation de HENNEGUY (cité dans FAURE-FREMIET, 1924 p. 284) qui a observé une femelle contenant des ovocytes en métaphase I.

4ème PARTIE

ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE LA REINITIATION DE LA MEIOSE

1 - Rôle du calcium

Grâce à l'ionophore A 23187, spécifique des cations divalents (REED *et al.* 1972), il a pu être montré que l'augmentation du calcium libre intracellulaire a un effet activateur sur les ovocytes de la quasi-totalité des espèces éprouvées (STEINHARDT *et al.* 1974). Toutefois, cette forme d'activation bien particulière qu'est le déblocage des ovocytes en prophase I, n'est possible par cet ionophore que chez certaines espèces. Ainsi l'ionophore est incapable de réinitier directement la méiose chez l'étoile de mer (SCHUETZ, 1975), l'arénicole (MEIJER, 1979 b) et le Xénope (HANOCQ *et al.* 1974), du moins dans les conditions ioniques physiologiques (WASSERMAN *et al.* 1975) alors qu'il est efficace chez *Urechis* (PAUL, 1975), *Spisula* (SCHUETZ, 1975), *Nereis* (CHAMBERS, 1974) et le chaetoptère (BRACHET, 1977). Cette différence de sensibilité est, à première vue, en rapport avec la nature du stimulus responsable de la maturation ovocytaire dans les conditions normales : un mécanisme de type hormonal pour les premiers, la fécondation ou le contact avec l'eau de mer pour les seconds.

Il a donc paru judicieux d'aborder l'étude du rôle du calcium dans la réinitiation de la méiose chez *Sabellaria* grâce à l'ionophore A 23187. Cela facilite en effet l'interprétation des expériences complémentaires de modification de la composition ionique du milieu extérieur ou d'action de diverses substances modifiant la perméabilité au calcium ou sa fixation par les membranes.

Matériel et méthodes

Les ovocytes sont préparés par le procédé habituel (voir 1ère Partie). Toutes les incubations sont faites en eau de mer artificielle tamponnée à pH 8,0

avec 20 mM/l d'HEPES (cf. 1ère Partie), sauf indication contraire.

Les milieux sans calcium ou magnésium sont préparés selon la formule habituelle en omettant le $CaCl_2$ ou le $MgCl_2$ et passés sur une colonne de "Chelex 100" (Bio-Rad) pour enlever les traces de ces éléments. L'osmolarité est réajustée avec une solution de NaCl également passée sur Chelex.

Dans certains cas la maturation est déclenchée par addition de protéase CT préparée par filtration sur Ultrogel (cf. 2ème Partie) ou de spermatozoïdes débarrassés des protéases contaminantes (cf 1ère Partie).

Les solutions mères d'ionophore A 23187, Nigéricine (dons gracieux des établissements E. Lilly), X 537 A (don gracieux des établissements Roche S.A.), valinomycine (Sigma) sont préparées dans le méthanol R.P. (Prolabo), la concentration finale de méthanol dans le milieu d'incubation ne dépassant en aucun cas 1%. Des expériences témoin montrent que cette concentration de méthanol est sans effet sur la maturation.

Autres produits : Sodium Dantrolène (don gracieux de Norwich Pharmacal); D 600 (0,2 M/l dans le méthanol); Isoptine (0,2 M/l dans le méthanol), dons de Knoll (AG); Propanolol, don de I.C.I.-Pharma; Oxyprenolol, don de Ciba-Geigy; Procaine, Tétracaine (Sigma); Chlorure de lanthane (Fluka); Chlorure de cobalt (Prolabo).

Résultats

Comme le montrent les résultats du tableau XVI, les antibiotiques ionophores de cations divalents (A 23187 et X 537 A) déclenchent la maturation de tous les ovocytes du lot, à des concentrations très éloignées de leur seuil de toxicité. Le A 23187, plus spécifique des cations divalents que le X 537 A (REED *et al.* 1972) est 10 à 50 fois plus actif que ce dernier. Les relations dose-réponse varient beaucoup d'une expérience à l'autre car ces ionophores sont très hydrophobes et ne donnent pas de solutions aqueuses stables. Ainsi la maturation est déclenchée à 50% pour des concentrations théoriques en ionophore variant, selon les expériences, de 2×10^{-8}M/l à 2×10^{-7}M/l pour le A 23187 et de $1,5 \times 10^{-6}$M/l à 10^{-5}M/l pour le X 537 A. Par contre les ionophores transportant le potassium et, à un moindre degré, les autres cations

TABLEAU XVI

Effet de divers antibiotiques sur la maturation

Antibiotique		% de maturation (± int. conf. 95%)	
Nature	Concentration (finale)	1 h d'incubation avec antibiotique	1 h d'incubation avec antibiotique, puis 1 h avec protéase en plus (a)
23187	10 nanoM/l	0 (+ 0,02/- 0,0)	-
	100 nanoM/l	9,0 (+ 3,2/- 3,1)	-
	1 µM/l	99,1 (+ 0,6/- 1,3)	-
537 A	1 µM/l	0,5 (+ 1,5/- 0,5)	-
	10 µM/l	82,9 (+ 3,4/- 3,9)	-
	100 µM/l	100 (+ 0,01/- 0,7)	-
alinomycine	100 µM/l	0,7 (+ 1,5/- 0,7)	100 (+ 0,0/- 0,7)
Igéricine (b)	14 µM/l	1,1 (+ 2,4/- 1,1)	98,3 (+ 0,8/- 1,5)

(a) 10 µl de protéase CT (séparée sur ultrogel) sont rajoutés à 2 ml, donnant une activité finale de $2,5 \times 10^{-3}$ u-BTEE/ml.

(b) Toxique à 70 µM/l

monovalents, ne sont ni initiateurs, ni inhibiteurs de la maturation, même à forte dose (valinomycine) ou à leur limite de toxicité (nigéricine).

Contrairement aux protéases, l'ionophore déclenche, en plus de la maturation, divers degrés d'activation parthénogénétique qui ne dépassent cependant pas l'achèvement de la méiose. Ainsi, plus de 90% des ovocytes traités en prophase par l'ionophore A 23187 ne se bloquent pas au stade métaphase I et émettent le premier globule polaire. Par la suite 50 à 70% des ovocytes émettent le deuxième globule polaire et forment le pronucleus femelle (planche XIV, A). Les chromosomes se recondensent ensuite mais il ne se forme qu'un monoaster au lieu du fuseau de première segmentation (planche XIV B). Dans la plupart des cas, la non émission du 2ème globule polaire ne correspond pas à un blocage car l'anaphase II se produit normalement mais les deux lots de chromosomes restent dans l'ovocyte et donnent deux pronuclei (planche XIV C). Toutefois, bien que ces ovocytes soient diploides et contiennent théoriquement les deux centrosomes du fuseau de deuxième division méiotique, ils ne se segmentent pas, et c'est un monoaster qui se reforme (planche XIV D). Ce résultat curieux est similaire à celui obtenu précédemment en empêchant l'émission des globules polaires par la cytochalasine B chez des ovocytes activés par une autre méthode ($CaCl_2$ hypotonique) (PEAUCELLIER *et al.* 1974). Cela confirme que l'absence de segmentation à la suite d'activation parthénogénétique

Légende de la planche XIV

Observation en microscopie optique d'ovocytes activés par l'ionophore A 23187 (10 µM/l final).

A,B,C,D : ovocytes activés en prophase.

Divers stades observés après 1 h 35 d'incubation continue avec l'ionophore : 2 globules polaires et pronucleus (A), 2 globules polaires et monoaster (B), 1 globule polaire et deux pronuclei (C), 1 globule polaire et monoaster avec 2 n chromosones (D).

Carmin acétique, x 700.

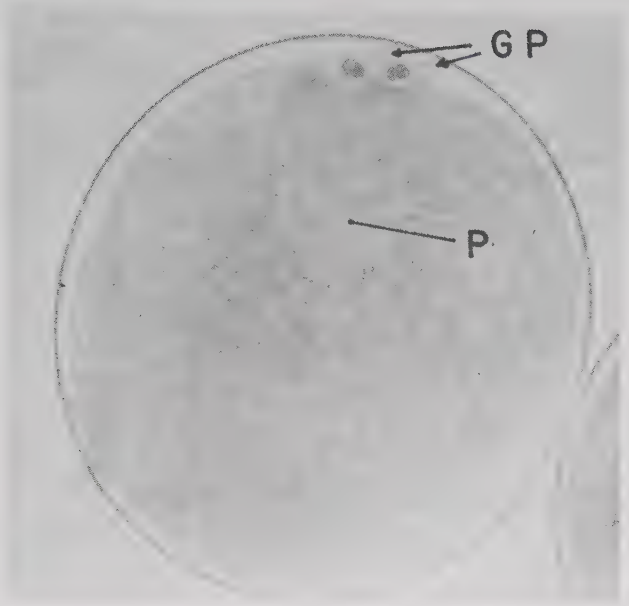
E,F : Ovocytes activés en métaphase I.

Stades observés après 2 h 35 d'incubation continue avec l'ionophore : déplacement des chromosomes vers la périphérie du monoaster (E), reformation d'un noyau (F).

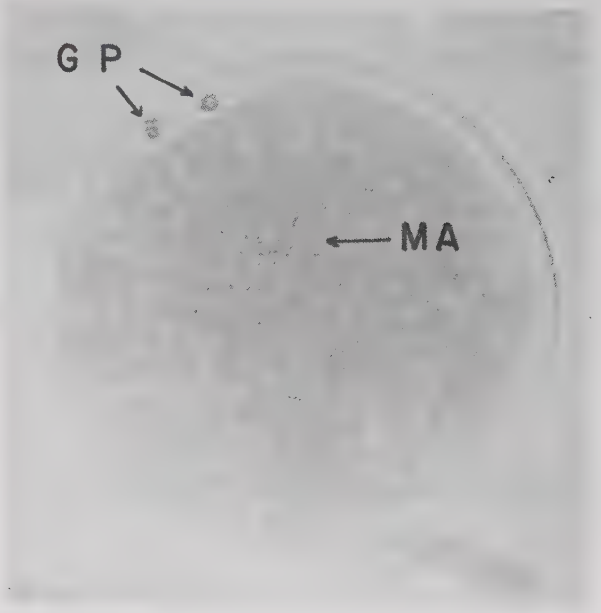
Carmin acétique, x 700.

GP, globules polaires; P, pronucleus; MA, monoaster; N, noyau.

A

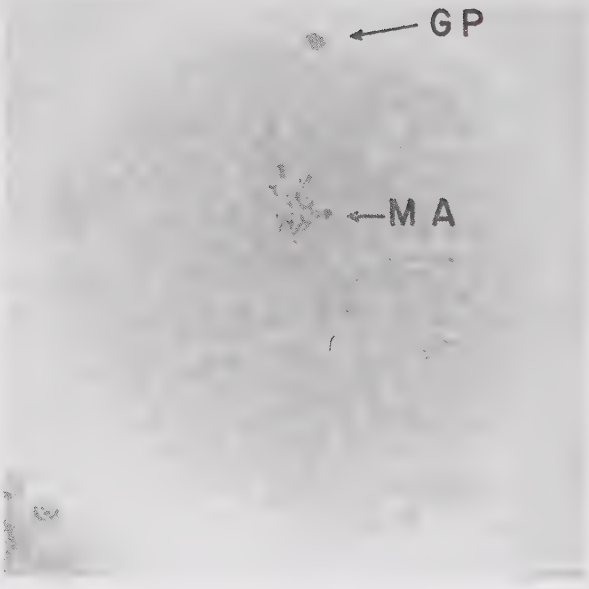


B

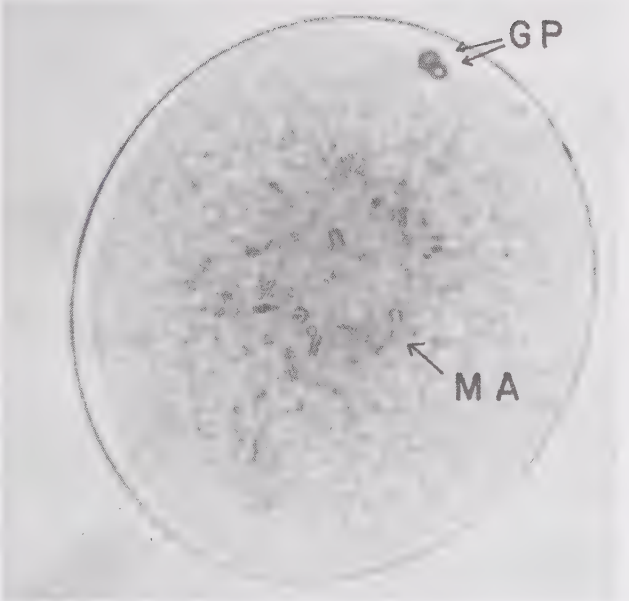


C

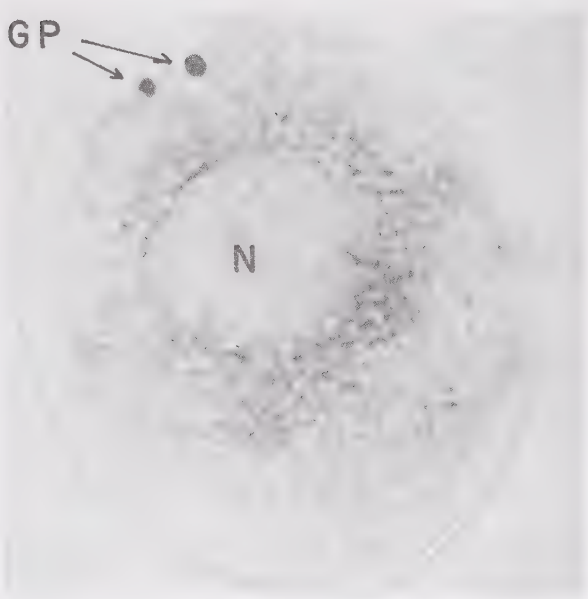
D



E



F



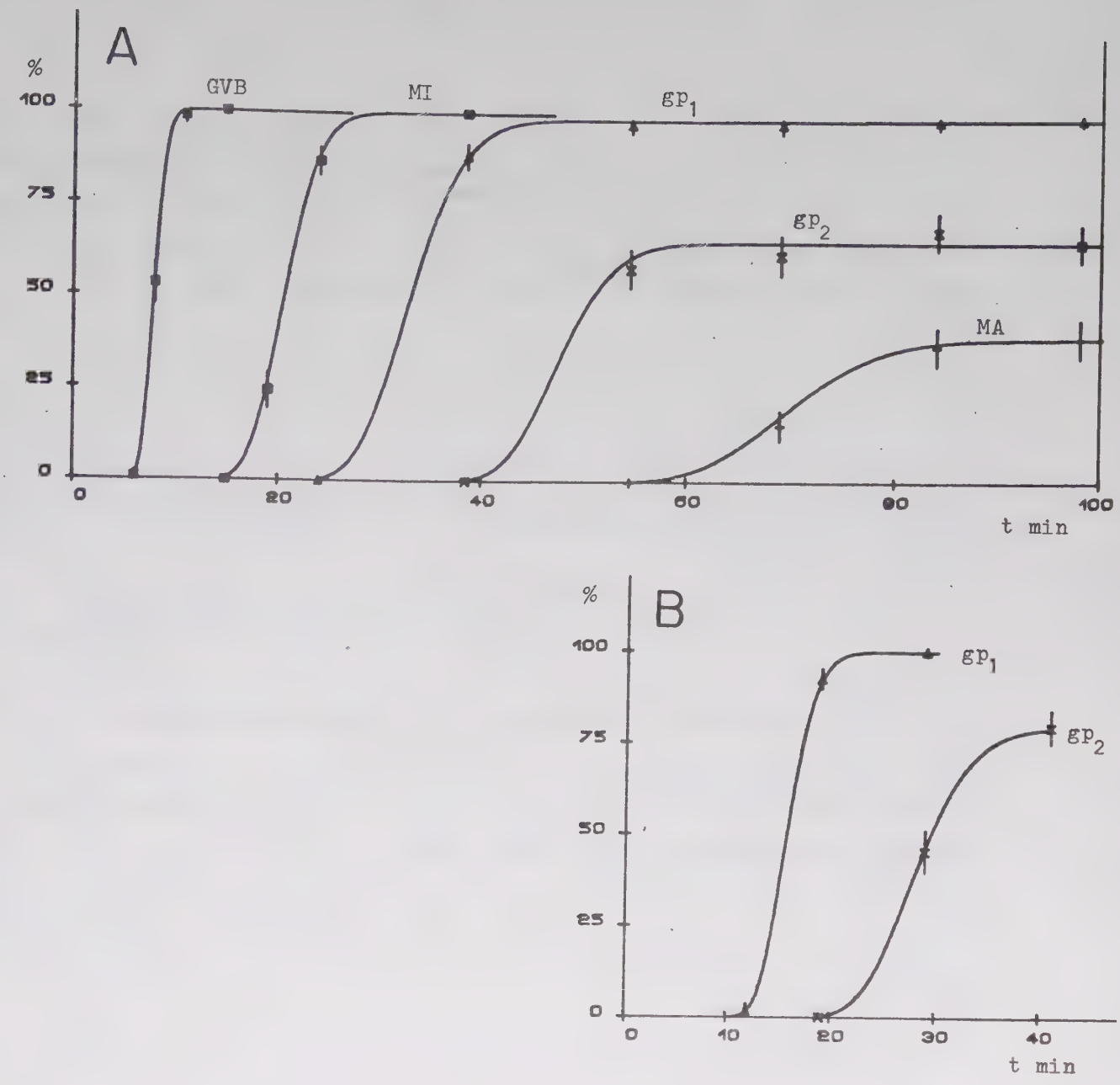


Figure 20

Chronologie de 1'activation par 1'ionophore A 23.187 (10 µM/1 final)

Les ovocytes sont incubés en continu avec 1'ionophore. Les pourcentages d'ovocytes ayant atteint ou dépassé un stade donné est déterminé après fixation et coloration de prélèvements faits à divers temps d'incubation. Les barres verticales indiquent 1'intervalle de confiance à 95 chances sur 100 des pourcentages.

A - Ovocytes activés en prophase I

GVB, vésicule germinative rompue;
MI, métaphase I
gp_1, premier globule polaire émis
gp_2, deuxième globule polaire émis
MA, monoaster

B - Ovocytes activés en métaphase I (après traitement par protéase)

gp_1, premier globule polaire émis
gp_2, deuxième globule polaire émis

n'est pas simplement due à l'haploidie et/ou à l'absence du centrosome spermatique. Il semble qu'au moins chez certains ovocytes, le stade monoaster soit suivi de plusieurs cycles monastériens au cours desquels un noyau se reforme, les chromosomes se dupliquent et un monoaster réapparaît (planche XIV E et F), comme cela a été décrit chez l'oursin (MAZIA, 1974).

Comme le montre la figure 20A, la chronologie de la méiose déclenchée par l'ionophore A 23187 est comparable à celle obtenue par fécondation. L'ionophore est également capable de réinitier la méiose d'ovocytes bloqués en métaphase I à la suite d'un traitement par protéase. Là aussi la chronologie du développement est comparable à celle des ovocytes fécondés après maturation (fig 20B).

Les résultats du tableau XVII montrent que, assez curieusement, non seulement la présence de calcium dans le milieu extérieur n'est pas nécessaire au déclenchement de la maturation par l'ionophore ou les protéases, mais qu'au contraire, l'absence de calcium déclenche la maturation d'une partie des ovocytes, même en l'absence de chélateur. Le pourcentage de maturation varie d'une expérience à l'autre mais est toujours significatif. L'absence de magnésium est sans effet, même sur la fécondation, alors que l'absence simultanée de calcium et de magnésium déclenche à 100% la maturation, ainsi que la dissolution de la membrane vitelline. Le taux de cytolyse est faible et, après retour dans l'eau de mer normale, la majorité des ovocytes est fécondable.

Ces résultats indiquent qu'on peut exclure la nécessité d'un influx de calcium pour la réinitiation de la méiose, puisque sa présence dans le milieu extracellulaire n'est pas nécessaire, contrairement au cas de *Urechis* (JOHNSTON *et al.* 1977) et *Spisula* (II *et al.* 1979). Néanmoins, une augmentation du calcium libre intracellulaire reste l'explication la plus vraisemblable de l'action des ionophores A 23187 et X 537 A. En effet, un transport accessoire de cations monovalents, bien que possible (LOWE *et al.* 1976), ne peut être invoqué puisque la valinomycine et la nigéricine sont sans action contrairement au cas du chaetoptère (BRACHET, 1977). D'autre part, le magnésium ne semble avoir aucun rôle puisque son absence du milieu extérieur ne change rien et que l'on sait que, contrairement au calcium, une grande partie est normalement sous forme libre dans le cytoplasme. C'est donc vraisemblablement à partir de stocks intracellulaires que l'ionophore libère du calcium dans le cytoplasme, comme dans le cas de l'oursin (CHAMBERS *et al.* 1974) ou l'étoile de mer (STEINHARDT *et al.* 1974) qui sont eux aussi activables en eau de mer sans calcium.

TABLEAU XVII

Influence de la composition ionique du milieu sur la maturation

Milieu incubation	% de maturation (± int. conf. 95%)			
	1 h d'incubation	1 h d'incubation plus 1 h après addition de :		
		A 23187 (1 µM/1)	Protéase (a)	Spermatozoïdes (b)
ns Ca 5 mM/1 EGTA	37,5 (+ 4,4/-4,7)	95,7 (+1,6/-2,2)	100 (+0,0/-0,8)	(c)
ns Ca	44,8 (+ 4,4/- 4,7)	99,2 (+0,7/-2,1)	100 (+0,0/-0,8)	(c)
ns Mg	0,2 (+ 1,5/- 0,2)	100 (+0,0/-0,8)	100 (+0,0/-0,8)	78,5 (+ 3,6/- 3,7)
ns Ca ni Mg 5 mM/1 EDTA	100 (+ 0,0/- 0,8)	-	-	-
ns Ca ni Mg	100 (+ 0,0/- 0,8)	-	-	-

) 10 µl de protéase CT (purifiée sur Ultrogel) sont rajoutés à 2 ml, donnant une activité finale de $2,5 \times 10^{-3}$ u-BTEE/ml.

) Spermatozoïdes lavés, concentration finale 10^7/ml.

) En l'absence de calcium, la morphologie et la motilité des spermatozoïdes sont altérées avec perte du pouvoir fécondant.

Divers ions et drogues connus pour modifier la perméabilité calcique ou la fixation du calcium dans les membranes se sont avérés capables de déclencher ou d'inhiber la maturation des ovocytes de diverses espèces. Des expériences similaires ont donc été réalisées chez *Sabellaria*, afin de mieux définir le rôle du calcium dans la maturation (Tableau XVII). Deux ions qui inhibent compétitivement le transport du calcium : le cobalt (NARAHASHI, 1974) et le lanthane (WEISS, 1974), ont été essayés en premier. Le cobalt n'a pas d'effet, hormis d'empêcher l'initiation de la maturation par l'ionophore, ce qui s'explique facilement car l'ionophore a une plus grande affinité pour le cobalt que pour le calcium (PFEIFFER *et al.* 1976). Au contraire, le lanthane initie la maturation à 100% comme chez le Xénope (SCHORDERET-SLATKINE *et al.* 1976$_b$). Le D 600 et l'isoptine (aussi appelée "Vérapramil") sont des drogues connues pour inhiber la perméabilité au calcium de certaines membranes biologiques (KOHLHARDT *et al.* 1972) et elles inhibent aussi la maturation des ovocytes de *Marthasterias glacialis* (GUERRIER *et al.* 1978). Il est donc surprenant qu'avec les ovocytes de *Sabellaria* elles initient des pourcentages variables de maturation. Toutefois ces effets ne sont obtenus qu'à des doses sub-toxiques, deux cent fois plus fortes que celles nécessaires pour inhiber la conductivité calcique dans les fibres cardiaques par exemple (KOHLHARDT *et al.* 1972). Le Dantrolène sodium est connu pour inhiber la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique des fibres musculaires (DESMEDT *et al.* 1976), mais il n'a aucun effet sur la maturation chez *Sabellaria*, même à son maximum de solubilité en phase aqueuse. La maturation est également induite chez les ovocytes de Xénope par des substances du type propanolol (SCHORDERET-SLATKINE *et al.* 1976$_a$), qui modifient les perméabilités ioniques par le biais d'une libération de calcium membranaire. Toutefois, chez *Sabellaria*, seules les doses subtoxiques d'oxyprénolol sont actives. Par ailleurs, les anesthésiques locaux procaine et tétracaine n'initient pas la maturation chez *Sabellaria*, même aux doses sub-toxiques, mais au contraire l'inhibent notablement. Un effet inhibiteur comparable de la procaine sur la maturation a été également signalé chez l'étoile de mer (MOREAU *et al.* 1978). Au contraire, chez le chaetoptère, ces drogues déclenchent la maturation (IKEGAMI *et al.* 1976). L'inhibition observée chez *Sabellaria* n'est pas due à un effet léthal puisque la maturation peut être déclenchée à nouveau, après lavage avec de l'eau de mer normale.

TABLEAU XVIII

Effet de différentes substances, modifiant la perméabilité ou la fixation du calcium, sur la maturation

ubstance	Concentration	Pourcentage de maturation (± int. conf. 95%)			
		1 h d'incubation	1 h d'incubation plus 1 h après addition de :		
			A 23187 (1 µM/l)	Protéase (a)	Spermatozoïdes (b)
o Cl_2 (c)	10 mM/l	0 (+ 2/- 0)	0 (+ 1/- 0)	100 (+ 0/- 1)	33 (+ 4/- 5)
a Cl_2 (c)	10 mM/l	100 (+0/ - 1)	-	-	-
600	0,5 mM/l	cytolyse	-	-	-
	0,2 mM/l	40 (+ 5/- 5)	-	-	-
	0,1 mM/l	2 (+ 3/- 2)	-	100 (+ 0/- 1)	-
soptine	0,5 mM/l	cytolyse	-	-	-
	0,2 mM/l	92 (+ 2/- 5)	-	-	-
	0,1 mM/l	13 (+ 5/- 4)	-	100 (+ 0/- 1)	-
antrolène	35 µM/l	1 (+ 2/- 1)	100 (+ 0/- 1)	100 (+ 0/- 1)	100 (+ 0/- 1)
xyprenolol	5 mM/l	cytolyse	-	-	-
	2 mM/l	30 (+ 5/-4)	-	-	-
	1 mM/l	3 (+ 3/- 3)	-	100 (+ 0/- 1)	-
ropanolol	5 mM/l	cytolyse	-	-	-
	25 mM/l	0 (+ 2/- 0)	-	cytolyse	-
rocaine	50 mM/l	cytolyse			
	25 mM/l	0 (+ 3/- 0)	0 + cytolyses	1 + cytolyses	0 + cytolyses
etracaine	1 mM/l	cytolyse	-	-	-
	0,5 mM/l	2 (+ 3/- 2)	2 (+3/-2)	97 (+ 1/- 2)	15 (+5/- 5)

(a) Protéase CT 2,5 x 10^{-3} u-BTEE/ml final

(b) Spermatozoïdes lavés, 10^7/ml final

(c) Dissous dans l'eau de mer artificielle sans sulfate ni bicarbonate. Cette modification n'a pas d'effet sur les témoins.

Ces résultats n'apportent donc pas la confirmation espérée de l'hypothèse initiale selon laquelle tous les traitements déclenchant la maturation auraient pour effet direct une augmentation du calcium libre intracellulaire. L'intervention du calcium dans la maturation sous l'effet des protéases est même mise en doute par l'absence d'effet inhibiteur des agents bloquants la perméabilité calcique. Dans le cas du cobalt, l'objection n'est pas très convaincante car on peut supposer qu'il a peu d'action au niveau intracellulaire. Par contre, le D 600 et l'isoptine étant liposolubles, devraient pénétrer à l'intérieur des ovocytes. Toutefois, l'action sélective de ces substances sur la perméabilité calcique n'a été démontrée que sur des systèmes biologiques très spéciaux,, comme les fibres musculaires cardiaques de mammifères. Il n'est donc pas du tout sûr qu'elles soient capables d'inhiber la libération de calcium intracellulaire dans un système aussi différent qu'un ovocyte d'invertébré marin.

Il faut en outre expliquer pourquoi la maturation est déclenchée à 100% par le chlorure de lanthane ou l'eau de mer sans calcium ni magnésium et, à des pourcentages variables, par l'eau de mer sans calcium et par diverses drogues à des doses sub-toxiques (dont l'effet est certainement très différent de l'action spécifique observée à faible dose sur d'autres types cellulaires). Une possibilité est que ces traitements entraînent la libération d'une partie du calcium fixé à la face interne de la membrane cytoplasmique. L'autre, plus vraisemblable, est que cette membrane est rendue perméable à des ions (autres que le potassium) , ce qui modifie la composition ionique du milieu intérieur,, entraînant le relargage de calcium par les organites qui l'accumulent normalement. Un tel processus pourrait également expliquer l'action des protéases.

Conclusion

Malgré la complexité apparente des résultats obtenus, on peut néanmoins en tirer plusieurs conclusions.

D'une part, l'élévation de la concentration du calcium libre intracellulaire est visiblement capable de lever le blocage prophasique des ovocytes de *Sabellaria*. Cela semble ainsi confirmer l'existence d'un mécanisme de réinitiation de la méiose différent selon que le contrôle est hormonal (batraciens, étoile de mer, arénicole) ou non (*Spisula*, *Urechis*, *Nereis*, Chaetoptère).

D'autre part une pénétration de calcium extérieur dans l'ovocyte n'est pas nécessaire à l'initiation de la maturation, que ce soit par l'ionophore, les protéases ou la fécondation. Ceci exclut que ce soit là l'action initiale des agents qui déclenchent la maturation mais n'exclut pas que l'augmentation du calcium libre intracellulaire soit indispensable, puisqu'il y a dans l'ovocyte des réserves de calcium mobilisables.

Enfin, la diversité des traitements qui s'avèrent capables de réinitier la méiose, incite à penser que des variations de perméabilité membranaire (autre que calcique) sont impliquées dans le déclenchement de la maturation chez *Sabellaria*.

2 - Rôle des variations de perméabilité membranaire

Si l'importance des changements de perméabilité membranaire est reconnue depuis longtemps pour les phénomènes électrophysiologiques des cellules excitables, ce n'est qu'assez récemment qu'elle a été admise pour l'initiation de la division cellulaire. Il apparaît ainsi que dans des systèmes variés allant de l'ovule d'oursin aux neurones de vertébrés, les modifications de la perméabilité aux ions monovalents sont aussi importantes que celles de la perméabilité calcique (KOCH *et al.* 1979). Ceci est d'autant plus intéressant que les protéases sont par ailleurs connues pour réinitier la division de certains de ces types cellulaires, comme les lymphocytes (KAPLAN *et al.* 1974) et les fibroblastes en culture (BOSMANN, 1977). Ces données renforcent donc l'hypothèse émise au chapitre précédent. Il a donc paru utile d'examiner si divers traitements connus pour perméabiliser les membranes sont capables de déclencher la maturation des ovocytes de *Sabellaria* et si certains flux d'ions monovalents sont modifiés.

Matériel et Méthodes :

Produits :

Nystatine (Sigma) dans le méthanol
Gramicidine (Sigma) " " "
Triton x 100 (scintillation grade) (Intertechnique)
Sodium dodécyl sulphate (SDS) (BDH)

L'irradiation UV a été faite avec une lampe "Mineral light" UVS-54 Ultraviolet products Inc.

Les flux de sodium ont été mesurés avec du ^{24}Na sous forme NaCl (CEA), activité initiale 0,5 mCi/ml, incorporé à de l'eau de mer artificielle tamponnée avec 20 mM Hepes à pH 8 selon la formule habituelle. L'eau de mer radioactive est ajoutée à des ovocytes maintenus en suspension par agitation (25 ml de suspension à 10^5 ovocytes/ml), 6 minutes avant addition de protéase, d'ionophore ou de spermatozoides débarrassés de protéases (concentration finale 10^7 spermatozoides/ml). A des temps

variés, 1 ml de suspension d'ovocytes est prélevé et injecté dans 4 ml d'eau de mer à 0°C. Avant déclenchement de la maturation trois prises de 1 ml de suspension sont isolées dans des tubes à hémolyse et agités par rotation. A divers temps, 4 ml d'eau de mer à 0°C sont ajoutés à ces tubes. A la fin de l'expérience, les tubes sont centrifugés 30 secondes à 1.000 g et les ovocytes lavés 3 fois avec 5 ml d'eau de mer à 0°C, puis dissous dans 3 ml de NaOH 1 N 15 min à 20°C ou 5 min à 100°C. L'homogénat est versé dans un pot de comptage à scintillation liquide en plastique, le tube est rincé avec 3 ml de NaOH 1 N qui sont rajoutés au pot de comptage. La radioactivité est mesurée par effet Cerenkov dans un compteur à scintillation liquide Intertechnique SL 30. Des expériences témoins ont montré que les échanges de sodium étaient négligeables pendant le stockage dans l'eau de mer à 0°C.

Résultats

Alors que des ionophores comme la valinomycine et la nigéricine transportent spécifiquement le potassium, la gramicidine et la nystatine sont peu spécifiques. En effet, ces derniers ne sont pas de vrais ionophores mais forment des canaux dans les membranes, comme cela a été démontré dans des membranes artificielles (GOMPERTS, 1977). Les résultats du tableau XIX montrent qu'ils sont capables de déclencher la maturation alors qu'il a été montré au chapitre précédent que la valinomycine et la nigéricine étaient sans effet. On remarque que l'effet de la gramicidine dépend du solvant organique dans lequel elle est dissoute puisque la solution méthanolique est plus efficace que la solution éthanolique alors que des expériences témoins montrent que ces solvants seuls (à une concentration finale de 1%) n'ont pas d'effet sur les ovocytes. La nystatine, qui est plus toxique, est aussi plus efficace que la gramicidine pour la réinitiation de la méiose. Cela est sans doute dû à la plus grande taille des pores qu'elle crée dans les membranes. Le Triton x 100 est un détergent non ionique très utilisé pour solubiliser les membranes et il a été montré qu'il est aussi capable de former des canaux dans des membranes artificielles (SCHLIEGER *et al.* 1977). Lui aussi déclenche la maturation des ovocytes de *Sabellaria* aux doses sub-toxiques. Les détergents ioniques du type SDS sont capables de déclencher la rupture de la vésicule germinative et un faible pourcentage d'activations parthénogénétiques chez les ovocytes de *Nereis* (OSTERHOUT, 1950) et *Pomatoceros* (MONROY, 1948). De même chez *Sabellaria*, le SDS déclenche la maturation et quelques pour cent des ovocytes dépassent le stade métaphase I. Le dernier traitement traumatique essayé est l'irradiation par les rayons ultraviolets, souvent utilisée pour déclencher l'activation parthénogénétique (TYLER, 1941; SCHEER *et al.* 1947; ALLEN, 1953). Là aussi, la maturation des ovocytes de *Sabellaria* est déclenchée par les irradiations sub-léthales.

TABLEAU XIX

Effet de divers traitements perméabilisant la membrane cytoplasmique sur le déclenchement de la maturation.

Traitement		% de maturation (± int. conf. 95%)	
Nature	Durée	1 h après le début du traitement	1 h d'incubation, puis 1 h avec protéase en plus *
Gramicidine D (0,1 mM/l final) dissoute dans :			
- éthanol (1% final)	continu	4 (+ 3/- 2)	100 (+ 0/- 1)
- méthanol (1% final)	"	48 (+ 7/- 7)	100 (+ 0/- 1)
Nystatine 10 µM/l	continu	cytolyse	-
Nystatine 5 µM/l	"	86 (+ 3/- 4)	100 (+ 0/- 1)
Nystatine 2 µM/l	"	3 (+ 2/- 2)	100 (+ 0/- 1)
Triton X 100 0,1 °/₀₀	30 min	cytolyse	-
Triton X 100 0,05 "	"	65 (+ 5/- 6)	100 (+ 0/- 1)
Triton X 100 0,02 "	"	3 (+ 6+- 3)	100 (+ 0/- 1)
SDS 0,1°/₀₀	15 min	cytolyse	-
SDS 0,5	"	93 (+ 4/- 5)	-
SDS 0,25	"	51 (+ 7/- 7)	-
SDS 0,1	"	3 (+ 5/- 3)	-
Irradiation UV (4 mW/cm² à 254 nm)	30 min	cytolyse	-
	10 "	60%	-
	3 "	0%	-

* Protéase CT $2,5 \times 10^{-3}$ u-BTEE/ml final

Ces résultats confirment que les maturations précédemment obtenues avec les doses sub toxiques de drogues à calcium sont vraisemblablement dues à une perméabilisation peu spécifique de la membrane à divers ions. Cette perméabilisation peut avoir divers effets, comme un efflux de potassium, un influx de sodium, de magnésium, de calcium, de chlore et peut-être de sulfate. En fait, certains de ces flux n'ont vraisemblablement pas d'effet sur le déclenchement de la maturation, vu les forts pourcentages obtenus avec des doses relativement faibles de nystatine. Il a été en effet montré que les canaux formés par la nystatine ne laissent passer ni les anions, ni les cations divalents. La nystatine ne peut donc agir qu'en déclenchant un efflux de potassium et un influx de sodium, si l'on suppose que la perméabilisation aux petites molécules non ionisée est sans effet. L'inefficacité de la valinomycine et de la nigéricine montre par ailleurs que l'efflux de potassium n'est pas suffisant pour déclencher la maturation. Ainsi, un influx de sodium est le responsable le plus vraisemblable de l'initiation de la maturation dans ces expériences. Cette hypothèse est également renforcée par le fait qu'il a été montré que les protéases aussi augmentent la perméabilité des membranes aux cations monovalents (PASSOW, 1971).

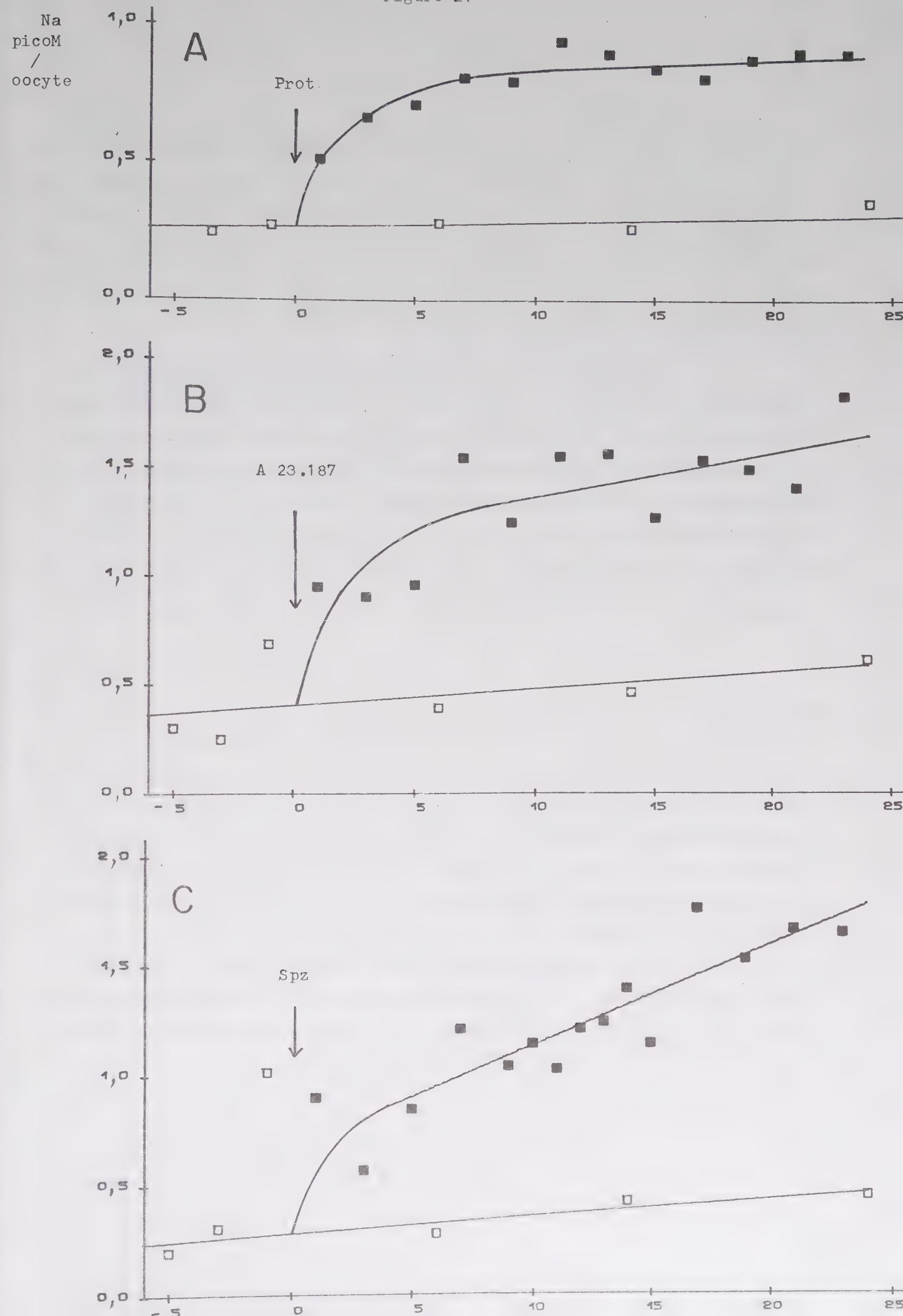
Un influx de sodium à la maturation peut en effet être mis en évidence avec du ^{24}Na comme traceur radioactif. Comme le montre la figure 21, lorsque la maturation est déclenchée par addition de protéase, d'ionophore ou par fécondation, on observe toujours un influx significatif de sodium dans les cinq premières minutes. Ces résultats ne sont pas assez précis pour permettre une comparaison significative des cinétiques obtenues avec les trois traitements. On peut néanmoins en conclure qu'il se produit à la maturation un influx compris entre 0,5 et 1 picoM de Na par ovocyte.

Légende de la figure 21

Influx de ^{24}Na lors de la maturation d'ovocytes déclenchée par divers traitements

Le ^{24}Na est ajouté aux ovocytes 6 min avant l'initiation de la maturation par addition de protéase (CT_2, 1,5 10^{-2} u BTEE/ml final) (A), d'ionophore (10 µM/l final) (B), ou de spermatozoïdes lavés (10^7/ml) (C). La radioactivité d'ovocytes traités (●) ou non (○) est mesurée à différents temps. Les valeurs indiquées en A et B sont les moyennes de deux expériences identiques. Dans tous les cas la maturation est déclenchée à 100%.

Figure 21


Na
picoM
/
oocyte
A
Prot
1,0
0,5
0,0
-5
0
5
10
15
20
25
B
A 23.187
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
C
Spz

Il n'a pas été possible d'incuber suffisamment longtemps les ovocytes en présence de ^{24}Na pour mesurer une éventuelle stimulation de l'efflux de sodium à la maturation. En effet, dans les suspensions denses d'ovocytes, le taux de cytolyse devient important après quelques heures et, en plus, les rinçages déclenchent la maturation de la plupart des ovocytes restés vivants. On ne peut donc savoir si la concentration intracellulaire du sodium augmente réellement à la maturation ou si l'augmentation des entrées est compensée par une stimulation de la pompe à sodium.

La conclusion la plus plausible est donc que la maturation peut être réinitiée soit par une modification directe du taux de calcium libre intracellulaire (ionophore A 23 187 en eau de mer sans calcium) soit par l'intermédiaire d'une augmentation de l'influx de sodium (protéase en eau de mer sans calcium). Ceci permet d'expliquer l'induction de la maturation dans la plupart des cas. Ainsi un influx de sodium peut résulter de la déstabilisation de la membrane en absence de calcium ou de calcium et de magnésium extérieur (OHMORI *et al.* 1977) ou bien de la modification des charges superficielles sous l'action des protéases par exemple (PASSOW, 1971).

Il est en outre vraisemblable que les concentrations de sodium et de calcium libre intracellulaire varient de pair lors de la réinitiation de la méiose. En effet, l'augmentation de la concentration en sodium déclenche la libération de calcium par les mitochondries dans divers types cellulaires (LOWE *et al.* 1976; SILBERGELD, 1977). Inversement, une augmentation du calcium intracellulaire augmente la perméabilité sodique de la membrane d'ovocytes d'ascidies (TAKAHASHI *et al.* 1978), ce qui expliquerait l'influx de sodium observé ici dans l'activation par l'ionophore. Cette hypothèse est également une de celles avancées pour expliquer l'influx de sodium observé dans l'ovocyte d'étoile de mer à la maturation (DOREE, 1981).

Enfin, un troisième flux ionique pourrait avoir son importance dans la maturation: l'efflux de protons associé dans les ovocytes de nombreuses espèces à l'influx de sodium et qui entraîne une augmentation du pH intracellulaire (EPEL, 1980).

3 - Libération d'acide

L'existence d'une libération d'acide lors de la fécondation chez l'oursin est connue depuis longtemps mais son interprétation est restée controversée jusqu'à une date récente (GIUDICE, 1973). C'est la découverte que l'essentiel de cet acide ne provient pas du contenu des granules corticaux mais d'un efflux de protons entraînant une augmentation du pH intracellulaire (JOHNSON *et al.* 1976) qui a suggéré que ce phénomène joue un rôle clé dans le processus d'activation. Cependant, une telle libération d'acide n'a été décrite que chez un petit nombre d'espèces autres que l'oursin : l'échiurien *Urechis* (PAUL, 1975) et le lamellibranche *Spisula* (II *et al.* 1979); alors qu'elle est absente au moins chez deux autres mollusques : *Mytilus* et *Acmea* (PAUL, 1975). Il était donc intéressant de tester son existence chez *Sabellaria*, d'autant plus qu'il est possible dans cette espèce de dissocier la maturation et l'activation. Cette étude a également été étendue, pour comparaison, à l'ovocyte d'étoile de mer (voir annexe 2).

Matériel et Méthodes :

Les ovocytes et les spermatozoides ont été préparés selon la méthode habituelle (voir 1ère Partie).

Pour les mesures de libération d'acide, les ovocytes sont suspendus dans de l'eau de mer artificielle (formule habituelle) tamponnée avec 5 mM/l de HEPES à pH 8,2. Il a été en effet observé que cette concentration de tampon stabilise la libération spontanée d'acide et limite les variations de pH dans une gamme où elles sont approximativement proportionnelles aux quantités d'acide libéré, ce qui facilite l'interprétation des résultats. De plus, la réduction des variations de pH rend négligeables les déplacements d'équilibre entre les bicarbonates et le CO_2 gazeux. La plupart des expériences sont faites avec 5 à 8 ml de suspension d'ovocyte (10^5 à 10^6 ovocytes/ml) dans un récipient thermostaté à 20°C. Les ovocytes sont maintenus en suspension par un barreau magnétique suspendu, pour éviter d'en écraser. Le pH de la suspension est mesuré par une semi-microélectrode combinée Ingold 405-M5 et un pH-mètre Metrohm E 512, relié à un enregistreur Sefram. Les titrations sont faites avec de la soude 0,1 N ajoutée par doses successives de 10 µl.

avec une micropipette ou un multidosimat E 415 (Metrohm).

Les autres produits utilisés dans ces expériences sont l'ammoniaque (solution mère à 1M/l ajustée à PH 8(avec NaOH) (Prolabo RP) et le chlorure de choline (Merck). L'eau de mer sans sodium est préparée en substituant dans la formule habituelle du chlorure de choline au NaCl et du $KHCO_3$ au $NaHCO_3$.

Résultats

Comme le montre la figure 22A, lorsque la maturation est déclenchée (dans 100 % des ovocytes) par addition de protéase, on observe une importante libération d'acide qui dure environ 9 minutes. Par contre, la deuxième addition de protéase, au moment où les ovocytes ont pratiquement achevé leur maturation, est sans effet, hormis un léger décalage dû au pH légèrement différent de la solution deprotéase. En tenant compte de ce décalage et en supposant que la libération spontanée d'acide avant addition de protéase correspond à une libération d'acide métabolique qui n'est pas notablement modifiée durant la maturation, on peut calculer par déduction la quantité d'acide spécifiquement

Légende de la figure 22

Libération d'acide lors de la maturation et de la fécondation d'ovocytes d'un même lot.

Chaque expérience est faite avec 8 ml de suspension d'ovocytes ($1,3\ 10^5$/ml).

A - Initiation de la maturation par addition de protéase CT (0,5 u BTEE/ml) (Prot)

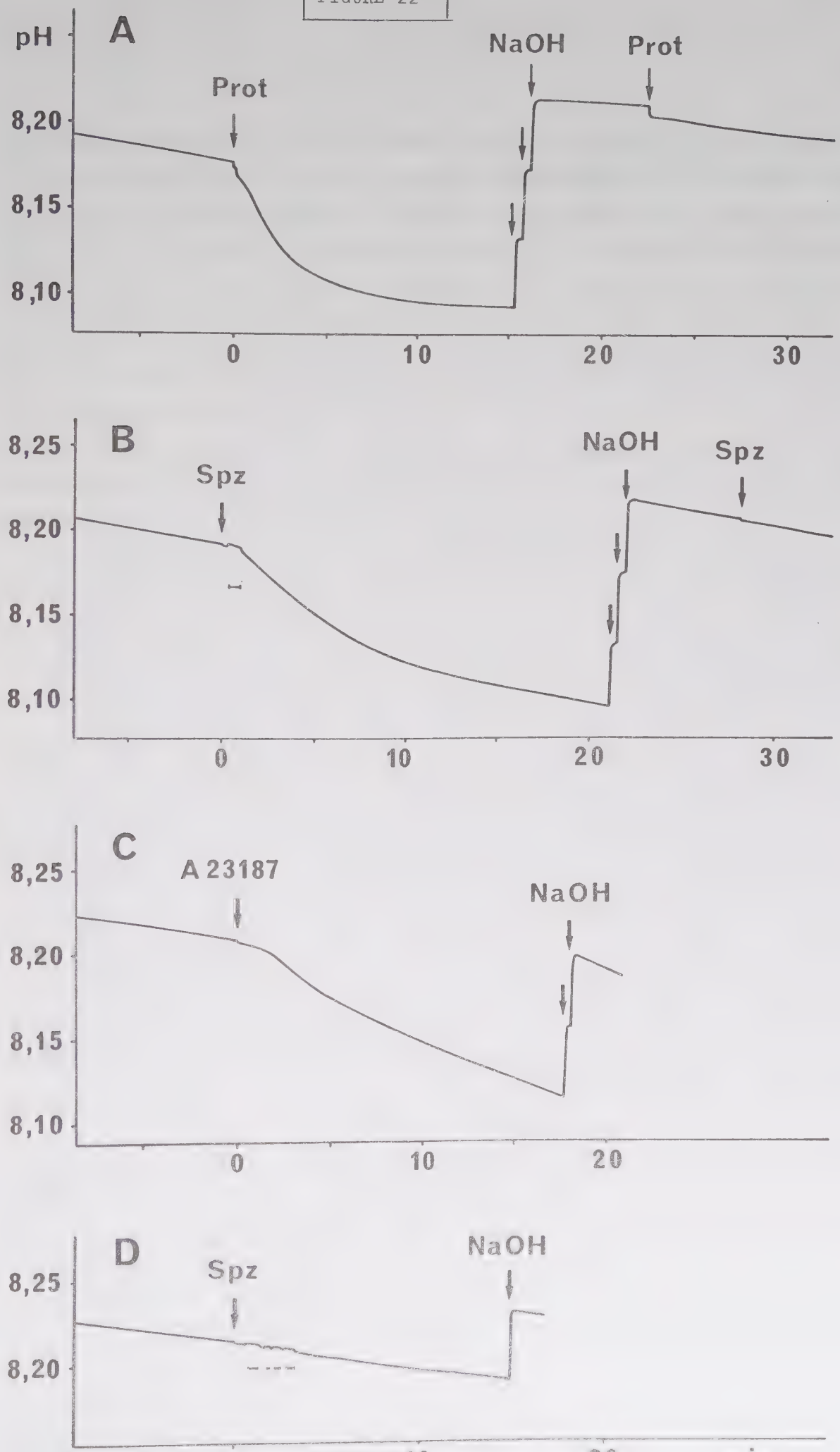
B - Fécondation d'ovocytes en prophase avec $4,2\ 10^6$ spz/ml final

C - Activation d'ovocytes en prophase par l'ionophore A 23187 (2,5 µM/l final).
Le taux de maturation est de 70% mais l'échelle du graphique a été modifiée pour correspondre à 100% d'activation, afin de permettre une comparaison directe avec les graphiques précédents.

D - Fécondation d'ovocytes en métaphase I (lot A lavé) avec $4,2\ 10^6$ spz/ml final. 27% de fécondation, échelle non modifiée.

Chaque flèche indique une addition de 10 µl de NaOH 0,1 N. Les traits horizontaux indiquent les périodes où l'agitation a été interrompue pour faciliter la fécondation.

FIGURE 22


A
pH
8,20
8,15
8,10
Prot
NaOH
Prot
0
10
20
30
B
8,25
8,20
8,15
8,10
Spz
NaOH
Spz
0
10
20
30
C
8,25
8,20
8,15
8,10
A 23187
NaOH
0
10
20
D
8,25
8,20
Spz
NaOH

libérée par l'initiation de la maturation. La valeur obtenue est dans cette expérience de 1,3 pico Eq d'acide par ovocyte durant les 9 premières minutes. Sur six expériences identiques la moyenne et l'écart type sont de 1,10 ± 0,25 pico Eq d'acide par ovocyte. La figure 22 B montre qu'une libération d'acide comparable se produit lors de la fécondation d'ovocytes en prophase I (99 % de fécondation). Toutefois elle est plus lente, s'étalent sur environ 14 minutes, ce qui peut être attribué à un moins bon synchronisme du déclenchement de la maturation. Un calcul similaire au précédent donne une libération de 1,24 pico Eq d'acide par ovocyte (1,20 dans une autre expérience). L'activation d'ovocytes en prophase par l'ionophore A 23187 déclenche aussi une libération d'acide (fig. 22 C). Toutefois dans cette expérience la maturation n'a été initiée que dans 70 % des ovocytes, sans doute par suite d'un mélange trop lent de la solution méthanolique d'ionophore lors de l'addition. La libération d'acide dure environ 12 minutes et corespond à 0,9 pico équivalent d'acide par ovocyte. Dans d'autres expériences, comme celle de la figure 23 D, où le taux d'activation est de 100 %, la libération d'acide est pratiquement aussi rapide que dans le déclenchement de la maturation par protéase. Sur quatre expériences identiques, la valeur moyenne et l'écart type de la libération d'acide est de 1,05 ± 0,11 pico Eq par ovocyte. Le délai initial de quelques minutes, apparent dans la figure 22 C, est sans doute caractéristique d'une activation liminaire car la même modification a été observée chez l'oursin (PAUL *et al.*, 1975). Une particularité de l'activation par l'ionophore est la persistance après la maturation d'un taux de libération spontanée d'acide notablement supérieure à la valeur initiale. Ceci peut correspondre à l'échange par l'ionophore de protons intracellulaire contre des cations divalents extracellulaires (REED *et al.*, 1971) ou à l'effet indirect de changements de perméabilité au niveau de la membrane cytoplasmique ou de celle d'organites intracellulaires. Il n'a pas été possible de détecter de libération acide lors de la fécondation d'ovocytes en métaphase I (figure 22 D). Toutefois, le taux de fécondation est toujours faible à cause de la forte concentration en ovocytes et de l'agitation nécessaire pour les mesures de libération d'acide (voir 3ème partie). Ainsi dans l'expérience de la figure 22 D, seulement 27 % des ovocytes ont été fécondés tandis que d'autres essais ont donné des pourcentages encore plus bas. Ces expériences permettent cependant d'exclure qu'il se produise à la fécondation en métaphase I une libération d'acide de même amplitude que celle observée à la maturation.

Ainsi, la libération d'acide observée chez *Sabellaria* ressemble à celle observée chez l'oursin et *Urechis*. La cinétique est similaire et la quantité libérée comparable, en particulier si elle est rapportée au volume cellulaire. Ainsi, en milliéquivalent d'acide libéré par litre de volume intracellulaire, la valeur moyenne est de 8,3 avec les protéases, 9,2 par fécondation et de 7,9 avec l'ionophore, alors qu'elle est de 5,2 chez *Urechis*, 6,7 chez *Strongylocentrotus purpuratus*, 7,2 chez *Dendraster excentricus* (PAUL, 1975), 8 chez *Psammechinus* (CUTHBERT *et al.*, 1978) et 6,8 chez *Spisula* (Ii *et al.*, 1979).

Il a été montré sur diverses cellules dont l'ovocyte d'oursin que l'addition d'ions ammonium au milieu extérieur entraîne une pénétration massive d'ammoniac dans ces cellules si leur pH intérieur est inférieur au pH extérieur (JACOB, 1940 ; WINKLER *et al.*, 1978). Le même phénomène s'observe avec les ovocytes de *Sabellaria* et l'absorption d'ammoniac entraîne une diminution du pH extracellulaire (figure 23 A). La quantité d'ammoniaque absorbée est d'environ 2 picomole/ovocyte ce qui correspond théoriquement à une concentration finale intracellulaire d'ammoniaque de 15 mM/l de cytoplasme. Il doit donc en résulter comme chez l'oursin (SHEN *et al.*, 1978 ; INOUE *et al.*, 1980 ; JOHNSON *et al.*, 1981) une alcanisation du pH intracellulaire qui devrait limiter la libération d'acide à la maturation. C'est effectivement ce qui est observé lorsque des ovocytes sont traités par la protéase (figure 23 C) ou l'ionophore (figure 23 E) après équilibration avec 10 mM/l d'ammoniaque. La libération d'acide est inhibée à plus de 95 % dans l'expérience avec protéase (figure 23 B et C) et à 65 % dans celle avec l'ionophore (figure 23 D et E). L'inhibition plus faible obtenue avec l'ionophore est peut être due aux échanges calcium/protons précédemment invoqués. Ces résultats, similaires à ceux obtenus sur l'oursin (PAUL *et al.*, 1976) permettent d'exclure que la libération d'acide observée à la maturation résulte de la libération de substances acides contenues dans les granules corticaux, puisque la réaction corticale n'est pas affectée par le prétraitement à l'ammoniaque. Cette interprétation a pourtant été mise en question chez l'oursin par NISHIOKA *et al.*,(1980) qui suggèrent que l'ammoniaque pourrait neutraliser le contenu des granules corticaux avant leur exocytose. Cette objection n'est cependant pas forcément valable car elle implique que la substance acide soit suffisamment hydratée à l'intérieur des granules corticaux intacts pour être ionisables, alors que les électronographies

Légende de la figure 23

Action de l'ammoniaque sur la libération d'acide lors de la maturation

A - Addition d'ammoniaque (10 mM/l final) à 5 ml de suspension d'ovocytes en prophase (2×10^5/ml). L'artefact dû au pH légèrement différent de la solution de NH_4Cl est indiqué au-dessus (le NH_4Cl est ajouté à 5 ml d'eau de mer sans ovocytes). Les flèches indiquent des additions de 10 µl de NaOH 0,1 N.

B, C - Effet de l'ammoniaque sur la libération d'acide déclenchée par protéase.

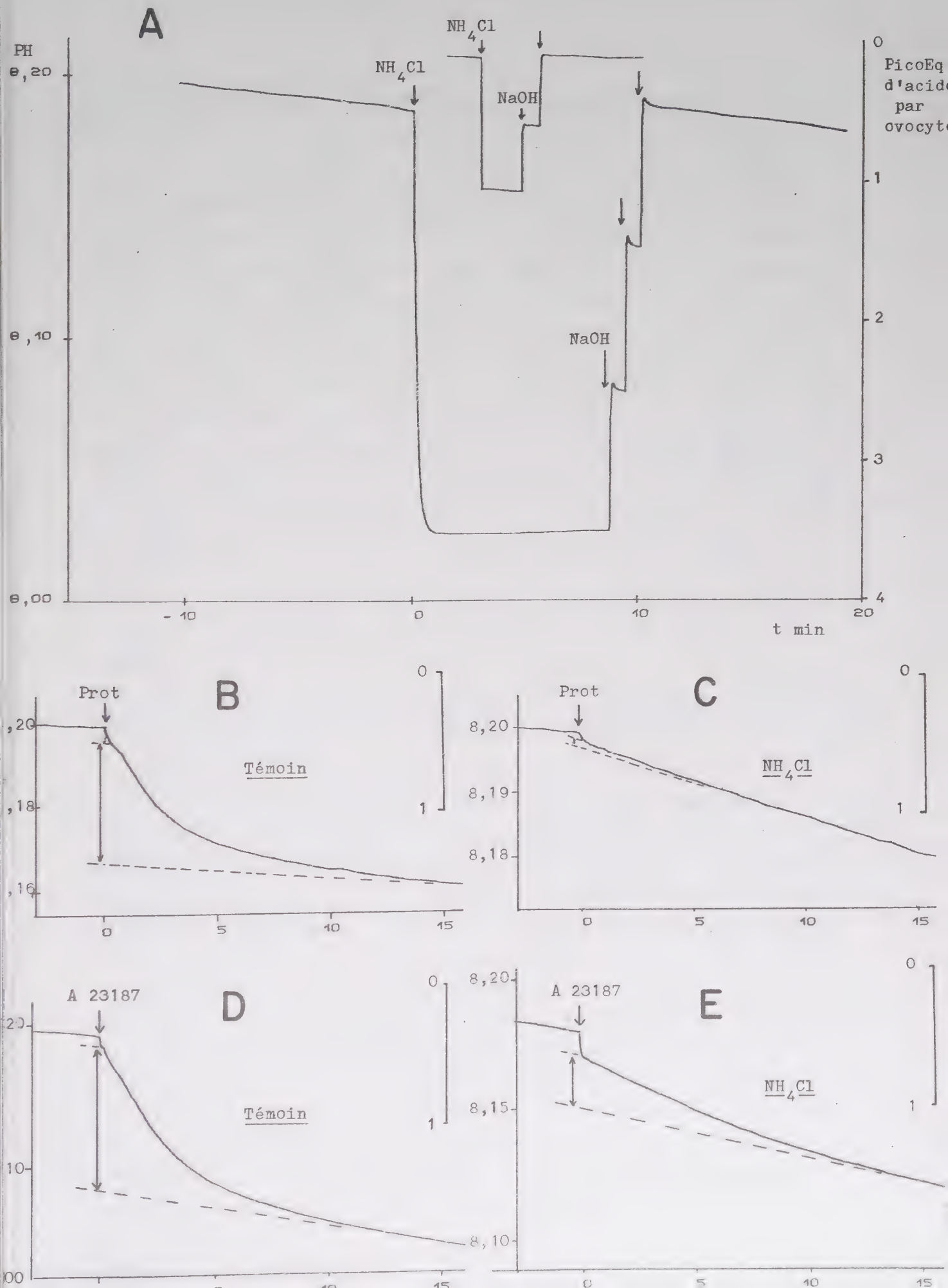
7 ml de suspension d'ovocytes d'un même lot en présence (C) ou en l'absence (B) de NH_4Cl (10 mM/l) sont additionnés de protéase CT_1 ($8,6 \times 10^{-3}$ u BTEE/ml). Dans les deux cas, la maturation et la réaction corticale sont déclenchées à 100%. B, $9,4 \times 10^4$ ovocytes/ml; C, $8,6 \times 10^4$ ovocytes/ml.

D, E - Effet de l'ammoniaque sur la libération d'acide déclenchée par ionophore.

5 ml d'ovocytes en prophase d'un même lot en présence (D) ou en l'absence (C) de NH_4Cl (10 mM/l) sont additionnés d'ionophore (10 µM/l final).

L'échelle de droite, commune aux 5 graphiques, indique la correspondance entre le pH extracellulaire et les pico équivalents d'acide libérés par ovocyte. Elle tient donc compte du pouvoir tampon supplémentaire introduit par le NH_4Cl et permet une comparaison directe des graphiques. La libération d'acide totale au cours de la maturation est également indiquée (double flèche verticale).

FIGURE 23


A
PH
8,20
8,10
8,00
NH_4Cl
NH_4Cl
NaOH
NaOH
0
1
2
3
4
PicoEq
d'acid
par
ovocyt
- 10
0
10
20
t min
B
Prot
Témoin
,20
,18
,16
0
5
10
15
0
1
C
Prot
NH_4Cl
8,20
8,19
8,18
0
5
10
15
0
1
D
A 23187
Témoin
20
10
00
0
1
0
5
10
15
E
A 23187
NH_4Cl
8,20
8,15
8,10
0
1
0
5
10
15

suggèrent l'inverse. D'autre part dans les expériences de NISHIOKA *et al.*, l'ionophore est utilisé comme activateur mais l'intervention d'un échange calcium/proton n'est pas envisagée.

Il est donc possible que chez *Sabellaria* comme chez l'oursin la libération d'acide corresponde à un efflux de protons couplé à un influx de sodium (JOHNSON *et al.*, 1976). C'est vraisemblablement le cas puisque, comme le montre la figure 24, la libération d'acide est influencée par la concentration en sodium dans le milieu extracellulaire. L'effet le plus apparent de la diminution du sodium dans le milieu est un ralentissement considérable de l'efflux d'acide : d'environ un facteur 5 pour 46 mM/l de NaCl (figure 24 B) et d'un facteur 10 en l'absence de NaCl (figure 24 A). La quantité totale d'acide libéré est difficile à estimer avec précision dans les expériences A et B mais on peut estimer qu'elle est inhibée à 60 % en l'absence de NaCl et à 30 % pour 46 mM/l de NaCl. En l'absence de NaCl, la maturation n'est pas bloquée mais elle est significativement retardée puisque la rupture de la vésicule germinative n'a lieu qu'environ 30 min après l'addition de protéase. On peut ainsi conclure que l'influx de sodium est normalement nécessaire à la maturation et à la libération d'acide, probablement par l'intermédiaire d'un échange sodium/proton. Toutefois, à la différence de l'oursin et de *Spisula*, l'absence de sodium dans le milieu extérieur ne bloque pas totalement la maturation et la libération d'acide, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de remplacement.

Tout comme pour le sodium, le rôle de cette libération d'acide reste très hypothétique. Théoriquement, si le milieu intracellulaire n'était pas tamponné, la libération de 10 mEq d'acide fort par litre de volume intracellulaire signifierait que le pH initial serait de l'ordre de 2. En réalité, il est vraisemblablement compris entre 6 et 7 car le fort pouvoir tampon du milieu intracellulaire limite les variations de pH. Néanmoins, les données obtenues sur l'oursin par des méthodes différentes comme la mesure du pH d'homogénats (JOHNSON *et al.*, 1976), l'utilisation d'électrodes pH intracellulaire (SHEN *et al.*, 1978), d'un acide faible radioactif (DMO = 5,5 dimethyl-2,4-oxazolidine-dione) (JOHNSON *et al.*, 1981) ou des variations de résonnance magnétique nucléaire du phosphore intracellulaire (INOUE *et al.*, 1980 ; WINKLER *et al.*, 1982) montrent que la libération d'acide est suivie d'une augmentation de 0,3 à 0,5 unités du pH intracellulaire. Cette variation de pH est suffisamment importante pour jouer un rôle dans le contrôle du

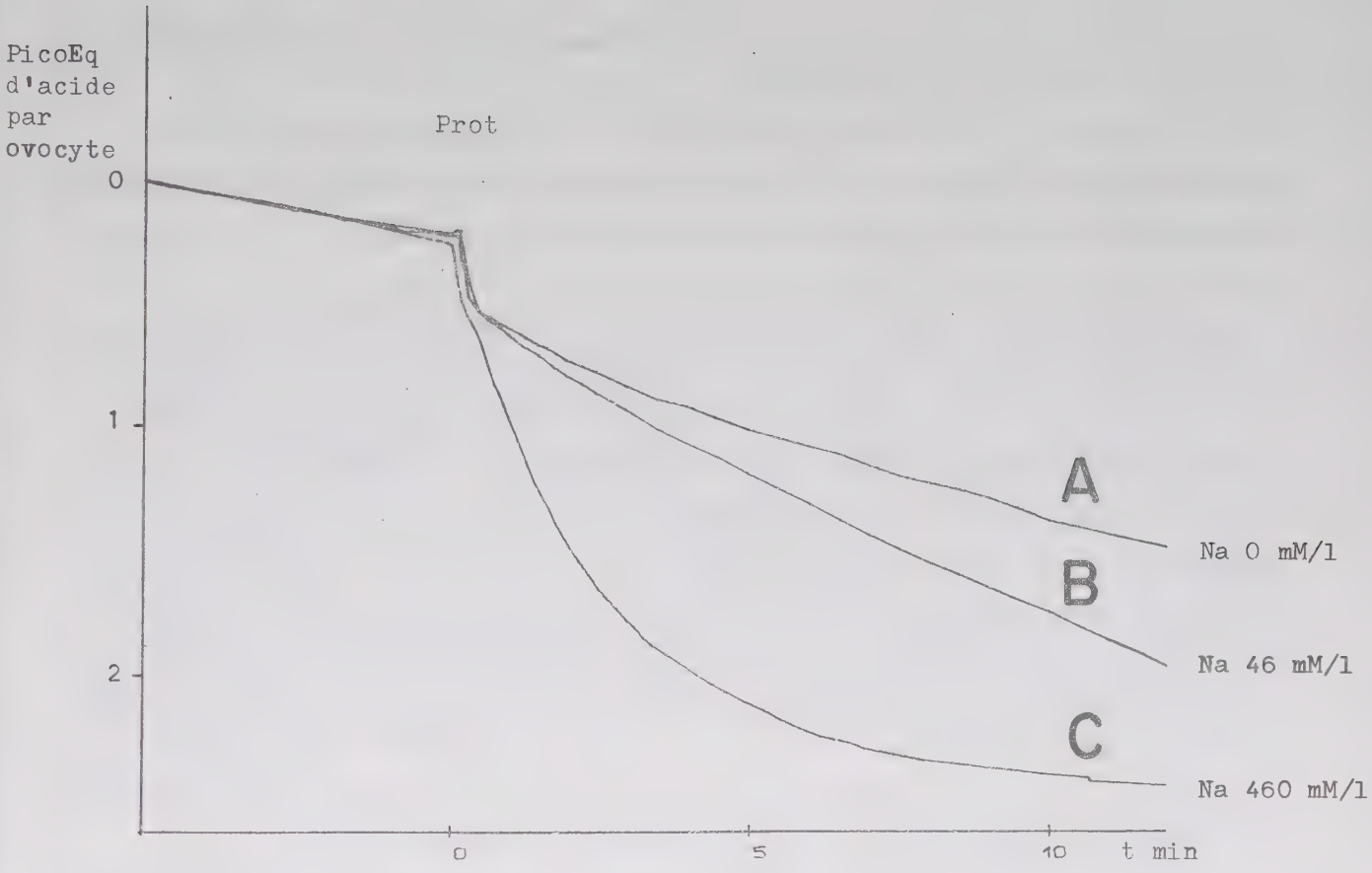


Fig. 24 - Libération d'acide en fonction de la concentration de sodium extracellulaire

Une suspension d'ovocytes bloqués en prophase est répartie en 3 lots. Les lots A et B sont lavés 3 fois avec 10 ml d'eau de mer artificielle sans NaCl (remplacé par du chlorure de choline), pure (A) ou mélangée avec de l'eau de mer normale (9 vol NaO/1 vol Na 460 mM/l) (B) et finalement remis en suspension dans 6 ml du même milieu (10^5 ovocytes/ml). La libération d'acide lors de l'addition de protéase CT_1 (10^{-2} u BTEE/ml) aux lots A et B, ainsi qu'au lot témoin laissé dans l'eau de mer normale, est ensuite enregistrée. Les trois courbes ont été superposées sur le graphique.

métabolisme. Ceci a été vérifié au moins chez une espèce d'oursin (*Lytechinus pictus*) où, même *in vitro*, la synthèse protéique passe de zéro à son optimum quand le pH est augmenté de 0,7 unités (GRAINGER *et al.*, 1979 ; WINKLER *et al.*, 1981). De même, le pH intracellulaire contrôle la perméabilité au potassium chez *Lytechinus pictus* (SHEN *et al.*, 1980).

Néanmoins, il semble que même chez l'oursin, les modalités de la libération d'acide et le rôle du pH intracellulaire varient d'une espèce à l'ature. Ainsi, chez *Strongylocentrotus purpuratus*, la libération d'acide sodium-dépendante est bloquée par un inhibiteur des échanges Na^+/H^+, l'amiloride. Par contre chez *Psammechinus miliaris*, l'amiloride est sans effet sur la libération d'acide (CUTHBERT *et al.*, 1978). L'action du pH intracellulaire sur la synthèse protéique ne semble pas non plus générale car elle n'a pas été retrouvée chez *Strongylocentrotus purpuratus*. Même l'interprétation de la libération d'acide comme un efflux de protons ne fait pas l'unanimité puisque GILLIES *et al.* (1981) présentent des arguments en faveur d'un efflux de gaz carbonique provenant de stocks intracellulaires de carbonate inorganique, chez *Strongylocentrotus purpuratus*.

Sur le plan de la physiologie comparée, *Sabellaria* est le seul cas connu où la libération d'acide semble associée à la maturation plutôt qu'à l'activation. En effet, chez *Spisula*, la fécondation ne peut se faire qu'en prophase I, les mécanismes de réinitiation de la méiose et ceux spécifiques de la fécondation sont donc confondus. L'étude faite sur l'étoile de mer (voir annexe 2) montre que chez les deux espèces étudiées, *Asterias rubens* et *Marthasterias glacialis*, aucune libération d'acide n'est observée lorsque la maturation est déclenchée (par la 1-méthyl adénine). Par contre, une libération d'acide, faible mais significative, est observée lors de l'activation par fécondation ou avec l'ionophore A23187, aussi bien d'ovocytes en prophase, que d'ovocytes en maturation. Toutefois, cette libération d'acide est vraisemblablement trop faible pour avoir des répercussions suffisantes sur le pH intracellulaire. Ainsi, à la différence de *Sabellaria*, on ne peut envisager que chez l'étoile de mer une variation rapide du pH intracellulaire soit impliquée dans la réinitiation de la méiose. Ce qui n'exclut d'ailleurs pas que des transferts de protons intracellulaires soient indispensables pour la maturation (DOREE *et al.*, 1980).

4 - Phosphorylation des protéines

Le rôle des changements de phosphorylation des protéines dans la régulation du métabolisme cellulaire a été surtout étudié dans les systèmes où intervient l'AMP-cyclique (c-AMP). Les études plus récentes ont cependant montré que les phosphorylations ne sont pas forcément modulées par le c-AMP (GREENGARD, 1978 ; KUO *et al.*, 1980). Dans les ovocytes d'amphibiens, une augmentation de la phosphorylation des protéines, au cours de la maturation, a été signalée dès 1972 (MORILL *et al.*) et son importance mieux perçue lorsqu'a été montrée sa relation avec l'apparition du MPF (MALLER *et al.*, 1977). Chez l'étoile de mer, un phénomène analogue a été décrit, *in vitro* (GUERRIER *et al.*, 1975) et *in vivo* (GUERRIER *et al.*, 1977). Les recherches ultérieures sur ces deux systèmes ont permis d'établir les relations entre le c-AMP et les phosphorylations chez le Xénope (HUCHON *et al.*, 1981), tandis que chez l'étoile de mer elles restent moins claires (DOREE, KISHIMOTO *et al.*, 1981).

Il était donc logique d'envisager l'existence de modifications de phosphorylation des protéines lors de la réinitiation de la méiose des ovocytes de *Sabellaria*, qui, contrairement aux deux autres systèmes, n'est pas sous contrôle hormonal. Il a paru également intéressant d'étendre cette étude à l'établissement et au levage du blocage métaphasique, facilement controlable chez *Sabellaria*.

Matériel et méthodes

Pour les expériences *in vivo*, les ovocytes bloqués en prophase (5 x 10^6 ovocytes/ml), préparés de la manière habituelle (cf 1ère partie), sont incubés en présence de 20 µCi/ml (fig. 25) ou 3 µCi/ml (fig. 26) de ^{32}P-orthophosphate sans entraineur (AMERSHAM), puis lavés trois fois, remis en suspension avec agitation mécanique et, selon les lots, traités ou non par protéase ou ionophore ou bien fécondés. A des temps variables, des aliquotes de 1 ml de suspension sont injectées dans 4 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 12,5 % à 0° C. Après 12 h d'incubation à 0° C, les échantillons sont centrifugés

et lavés 2 fois avec 5 ml de TCA 10 %, une fois avec de l'éthanol, puis chauffés à 95° Cependant 15 min dans du TCA 7,5 %. Après deux lavages supplémentaires au TCA 7,5 %, les culots sont dissous dans 6 ml de NaOH 1 N qui sont ensuite transférés dans des pots de comptage. La radioactivité est mesurée directement par effet Cerenkov dans un compteur à scintillation liquide Intertechnique SL 30.

Pour les électrophorèses, les ovocytes sont préchargés de la même façon mais en présence d'une plus forte concentration de ^{32}P : 300 µCi par ml de suspension (10^5 ovocytes/ml), pendant 1, 3 ou 13 h. Après lavage, les ovocytes sont répartis dans des petits tubes en matière plastique (1 ml/tube) auxquels sont ajoutés ensuite soit 10 µl de protéase CT_2 (3 unités BTEE/ml) soit 10 µl d'ionophore A23187 (0,2 ou 1 mM/l) ou 10 µl de sperme lavé (10^9 spermatozoïdes/ml). Les tubes sont agités manuellement de temps à autre jusqu'à la fin de l'expérience. Après prélèvement de 100 µl de suspension pour l'examen cytologique, les tubes sont centrifugés et le culot d'ovocyte est lysé par addition de 300 µl de "solution d'arrêt" (β-mercaptoéthanol 5 %, SDS 2 %, glycérol 10 %, Tris-HCl pH 6,8 20 mM/l). L'homogénat est bouilli pendant 3 min et stocké à - 20° C jusqu'à emploi. Pour les électrophorèses bidimensionnelles, la procédure est similaire, hormis la solution d'arrêt qui contient 5 % de β-mercaptoéthanol, 2 % de Nonidet P-40 (BDH), 0,4 % d'Ampholine pH 3-10 (LKB), 1,6 % d'Ampholine pH 5-7 et 9,5 M d'urée (Merck), d'autre part, l'homogénat ne subit l'ébullition.

Pour les expériences *in vitro*, environ 1 ml d'ovocytes bloqués en prophase I ou en métaphase I sont mis en suspension et homogénéisés à la main, avec un homogénéiseur de Potter, dans 10 ml d'une solution à 0° C contenant 0,1 °/$_{oo}$ de Leupeptine, 2 mM/l de PMSF, 2 mM/l d'EDTA, 10 mM/l de β-mercaptoéthanol, 0,25 M/l de saccharose (Merck) et 20 mM/l de Tris-HCl PH 7,5. Ces homogénats sont conservés à -20° C jusqu'à l'emploi (3 mois plus tard). Après décongélation, ils sont réhomogénéisés de la même façon, et soit utilisés directement ("homogénat"), soit centrifugés à 100.000 g pendant 30 min. Le surnageant limpide est utilisé tel quel ("S100"), tandis que le culot est remis en suspension dans du tampon phosphate (50 mM/l, pH 7,5) contenant 0,1 mM/l de dithiotreitol (DTT) (Sigma) jusqu'à obtention d'une

concentration en protéine de 20 mg/ml. Cette suspension est additionnée d'un volume d'une solution contenant 1°/$_{oo}$ de Triton x 100, 1°/$_{oo}$ de désoxycholate de sodium (Sigma), 0,1 mM/l de DTT et 50 mM/l de tampon phosphate pH 7,5. Le mélange est agité pendant 15 min à 4°C puis centrifugé à 100.000 g pendant 1 h. Le surnageant limpide contenant environ 8 mg/ml de protéines est utilisé pour les expériences ("P100") et le culot éliminé. Les concentrations en protéine sont déterminées selon la méthode de BRADFORD (1976).

La phosphorylation des protéines endogènes est étudiée *in vitro* dans des conditions standardisées : 10 µl d'"homogénat" (ou"S100" ou "P100") sont ajoutés à 20 µl d'une solution contenant 10mM/l d'acétate de magnésium, 2 mM/l de DTT, 1 mM de (γ ^{32}P)-ATP (100 à 150 cpm/picoM) et 25mM/l de Tris-HCl pH 7,5. Après 10 min d'incubation à 30° C, 1 volume de "solution d'arrêt" au SDS est ajouté puis le mélange est bouilli pendant 3 min. L'inhibiteur thermostable de la protéine-kinase thermostable c-AMP dépendante (PKI) a été préparé et stocké selon la procédure de DEMAILLE *et al.*, (1977).

Les électrophorèses sont effectuées selon la technique de LAEMMLI (1970) avec des gels présentant un gradient linéaire de 5 % à 20 % d'acrylamide. Les poids moléculaires sont estimés en soumettant à électrophorèse, dans les mêmes conditions, un mélange de protéines purifiées (Pharmacia) contenant de la phosphorylase du glycogène (94.000 daltons) de l'albumine (43.000 daltons) de l'anhydrase carbonique (30.000 daltons), du SBTI (20.100 daltons) et de la lactalbumine (14.400 daltons). Les gels sont fixés et colorés dans une solution contenant 0,25 % de bleu de coomassie R250 (Merck), 40 % de méthanol et 10 % de TCA, puis décolorés dans un mélange contenant 40 % de méthanol et 7,5 % d'acide acétique. Dans certaines expériences témoins les gels sont traités pendant 15 min à 90°C par du TCA 5 % avant décoloration. Après séchage sous vide, les gels sont soumis à antoradiographie avec des films X-OMAT, XR-1 (Kodak).

Les électrophorèses bidimensionnelles par focalisation au point isoélectrique (IEF), suivie d'électrophorèse en présence de SDS sont effectuées

selon la méthode de O'FARRELL (1975) mais avec des ampholines pH 4-6 au lieu de pH 5-7 dans la solution du gel IEF et des gels à gradient de 5% à 20% d'acrylamide pour l'électrophorèse.

La détection des phosphoprotéines sur gel est effectuée selon la méthode de CUTTING *et al.* (1973). Le phosphate est dosé dans les morceaux de gel selon la méthode décrite par MALLER *et al. (1977).*

Résultats

L'absorption de phosphate est pratiquement nulle dans les ovocytes bloqués en métaphase I, de même que dans ceux en cours de méiose (après traitement à l'ionophore A 23187) alors qu'elle est très forte dans les ovocytes bloqués en prophase, qui peuvent absorber jusqu'à 10% de la radioactivité du milieu d'incubation en 1 h. La radioactivité absorbée par les ovocytes reste stable, au moins 2 h. après lavage avec de l'eau de mer non radioactive, même si la maturation est déclenchée par protéase ou ionophore ou fécondation. Seulement un quart environ du phosphate absorbé par les ovocytes reste sous forme phosphate (fraction de la radioactivité TCA-soluble non retenue sur charbon actif) et cette valeur reste, elle aussi, stable pendant 2 h au moins. Le reste du phosphate absorbé est donc vraisemblablement incorporé dans des précurseurs TCA-solubles, dont l'ATP, et, pour une part plus faible, dans les macromolécules TCA-insolubles.

La figure 25 montre que le déclenchement de la maturation par addition de protéases à des ovocytes bloqués en prophase, préchargés en ^{32}P-phosphate entraîne une augmentation de la vitesse d'incorporation de phosphate radioactif dans les protéines. Cette augmentation est déjà discernable 1 min après l'addition de protéase et elle est maximale jusqu'à la rupture de la vésicule germinative (jusqu'à 50 fois la vitesse d'incorporation des témoins), puis elle décroît jusqu'à une vitesse de l'ordre de 5 fois celle des témoins. La décroissance de la vitesse d'incorporation ne peut être attribuée à une diminution de la concentration en précurseurs marqués, puisque la radioactivité incorporée ne dépasse pas 5% de la radioactivité TCA-soluble des ovocytes à 23 min. A la fin de cette expérience, la radioactivité des protéines est 4,4 fois plus forte dans les ovocytes en métaphase I que dans les témoins restés bloqués en prophase.

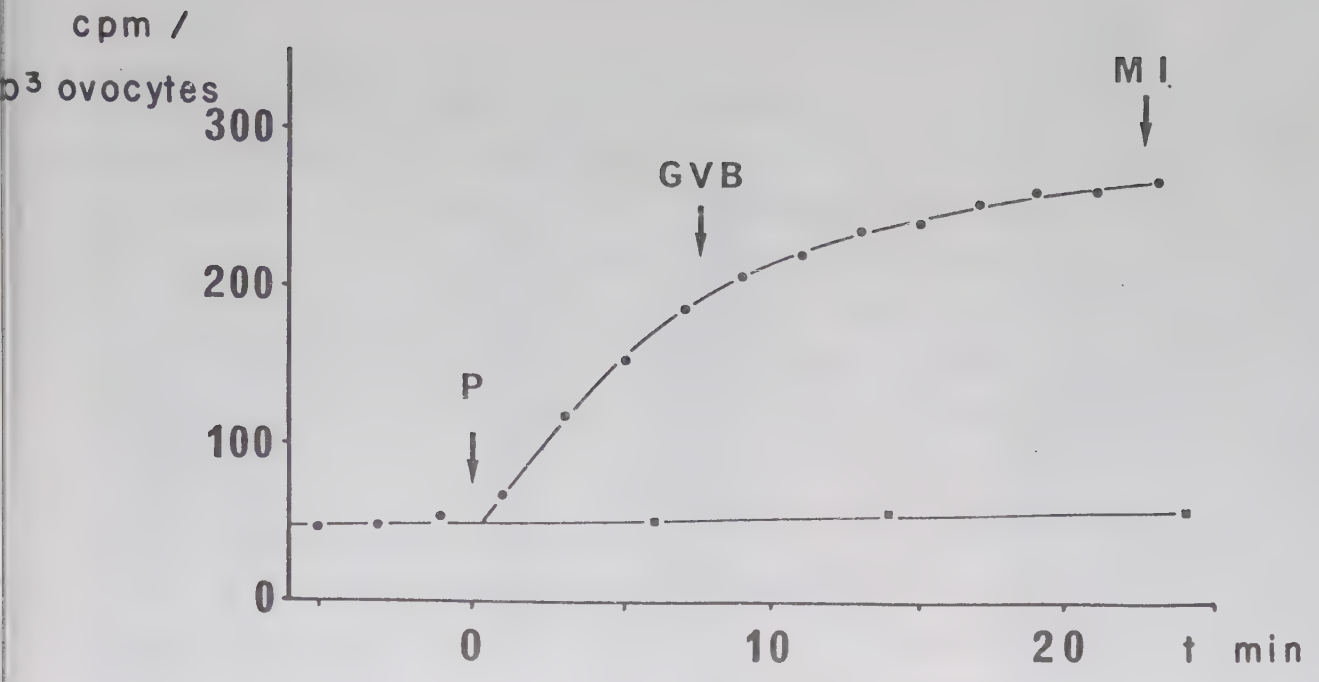


Fig. 25 - Incorporation de ^{32}P dans les protéines durant la maturation.

Les ovocytes sont préchargés en ^{32}P pendant 70 min, lavés puis l'incorporation est mesurée dans des aliquotes prélevées à différents temps avant ou après addition de protéase CT_2 (P) ($1,4 \times 10^{-2}$ u BTEE/ml final) (●), ainsi que dans 3 témoins isolés avant addition de protéase (■). Sont également indiqués les temps où 50% des ovocytes ont la vésicule germinative rompue (GVB) ou ont atteint le stade métaphase I (MI).

L'augmentation d'incorporation de phosphate radioactif dans les protéines est également bien visible sur les autoradiographies de gel d'électrophorèse (planche XV). Le fait que la répartition de la radioactivité ne soit pas modifiée par le traitement ou non au TCA 5% à chaud implique que ce sont bien des protéines et non des acides nucléiques qui sont marqués (planche XV A et B). Les protéines incorporant le phosphore radioactif sont très nombreuses et ont des poids moléculaires très variables, aussi bien dans les témoins que dans les maturés. La comparaison dans la planche XV A de l'autoradiographie des maturés exposée 2 j et des témoins exposés 20 j montre en plus que la grande majorité des phosphoprotéines ont subi une augmentation d'activité spécifique sensiblement identique lors de la maturation (le marquage diffus en bas des autoradiographies correspond au front de migration). On remarque également que des protéines peu marquées subissent apparemment la même augmentation d'activité spécifique que celles très marquées, comme la paire de 38.000 et 40.000 daltons. L'exception la plus évidente se situe au niveau 18.000 daltons, où l'augmentation d'activité spécifique est considérablement plus forte. Comme la coloration des protéines par le bleu de Coomassie ne montre, à cet endroit, aucune différence entre les témoins et les maturés, on peut conclure qu'il y a là une protéine qui est spécifiquement phosphorylée à la maturation. Il est

Légende de la planche XV

Electrophorèse et autoradiographie d'homogénats d'ovocytes préchargés en ^{32}P.

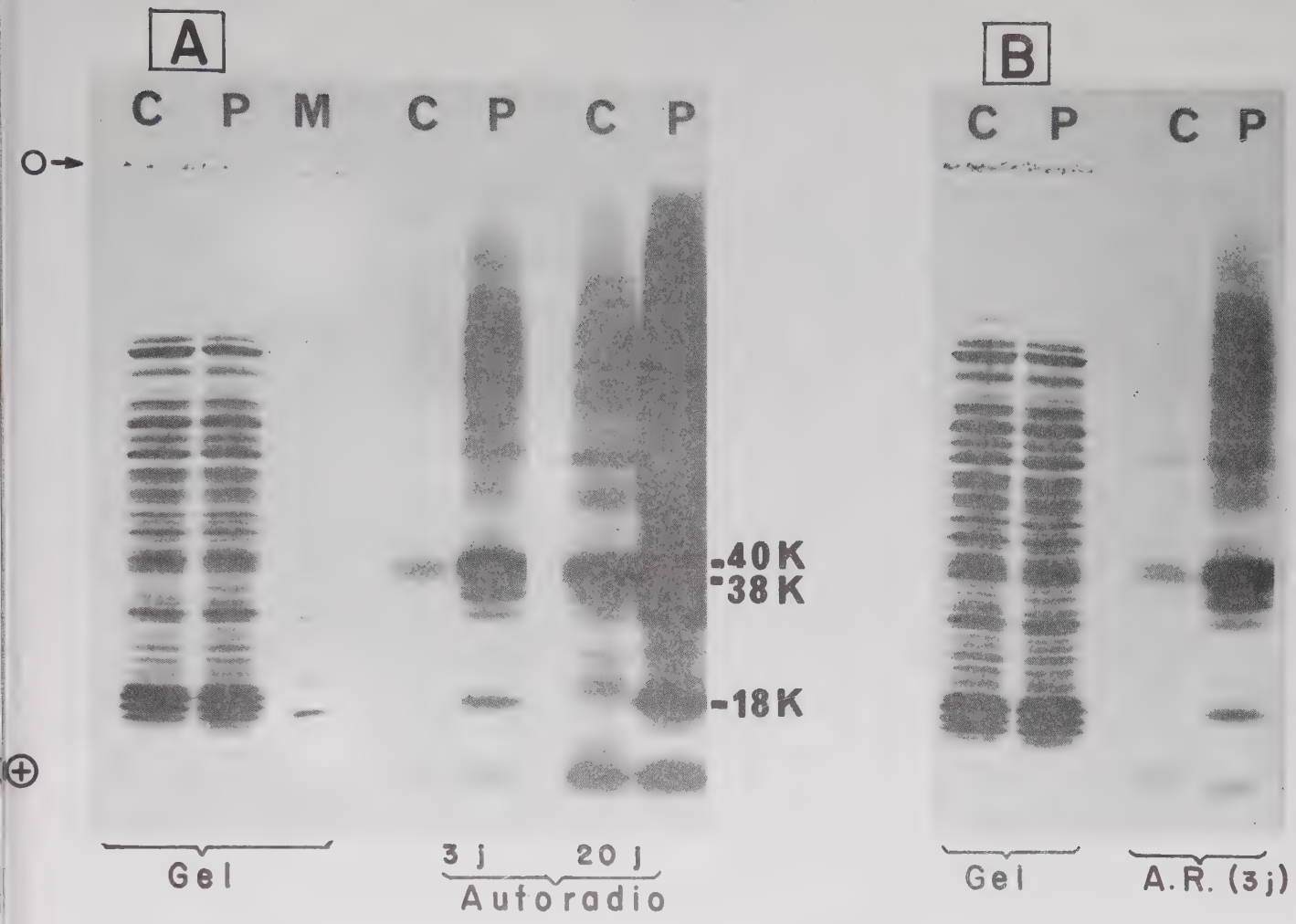
A - Après 3 h de préchargement en prophase I et lavage, la moitié des ovocytes (P) est additionnée de protéase CT_2, l'autre moitié laissée intraitée (C). Les deux sont homogénéisées 30 min plus tard, lorsque 100% des ovocytes traités sont en métaphase I. Les homogénats et des marqueurs de poids moléculaire (M) sont soumis à électrophorèse et le gel coloré pour visualiser les protéines, puis séché. La localisation du ^{32}P dans le gel est déterminée par autoradiographie. K = kilodalton.

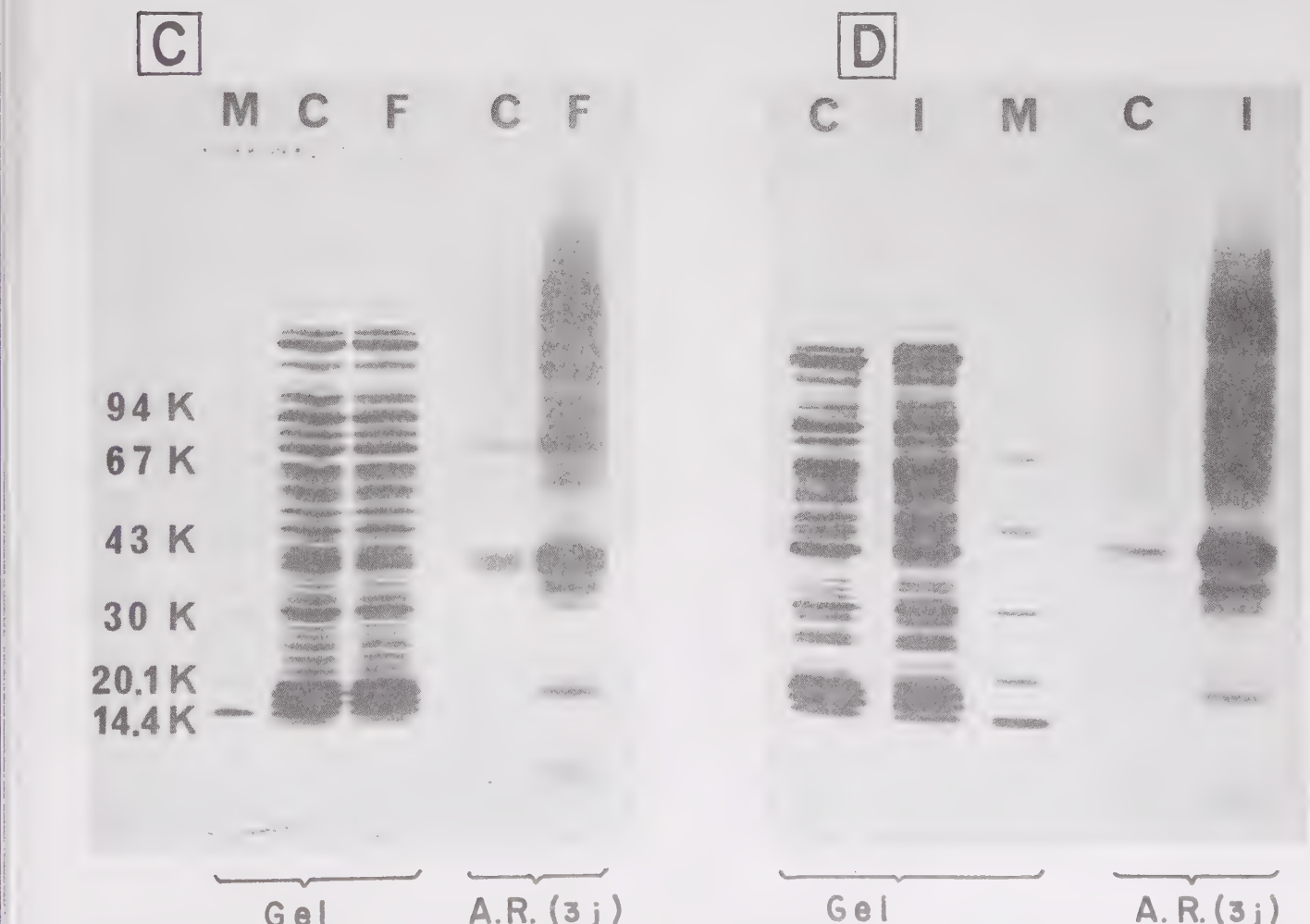
B - Comme A, mais les gels ont été traités au TCA 5% à 90°C pendant 15 min avant séchage et autoradiographie.

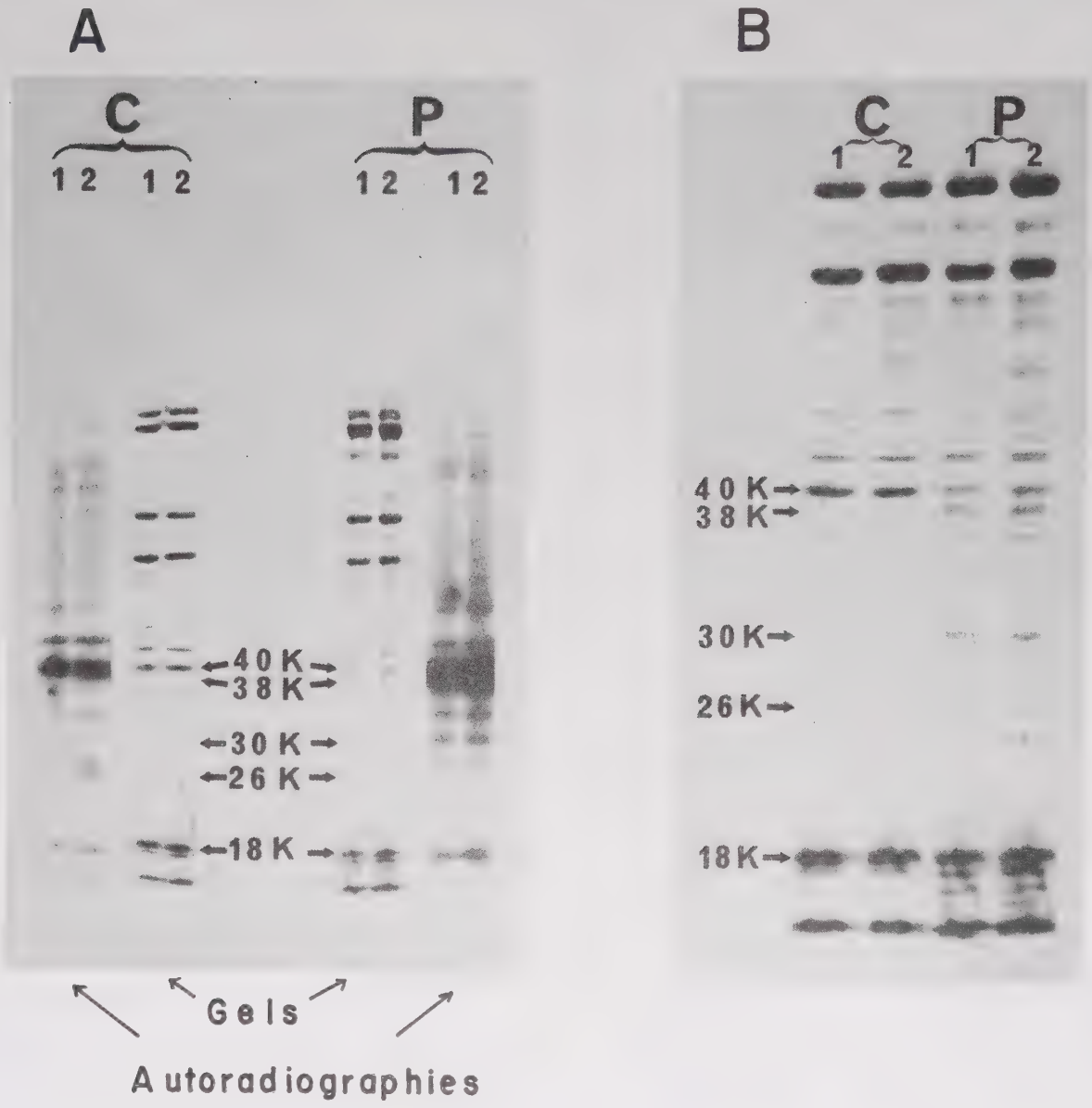
C - Comme A mais la maturation est déclenchée par addition de spermatozoïdes lavés (10^7/ml final). Témoins (C) et fécondés (F) sont homogénéisés 30 min plus tard lorsque les fécondés (84%) sont en métaphase I.

D - Comme A mais 1 h seulement de préchargement et la maturation est déclenchée par addition d'ionophore A 23187 (10 µM/l final).

L'homogénéisation est faite 30 min plus tard lorsque les activés (I) sont en métaphase I (100%).


A
C P M C P C P
-40K
-38K
-18K
Gel
3 j 20 j
Autoradio
B
C P C P
Gel
A.R. (3j)


C
M C F C F
94 K
67 K
43 K
30 K
20.1K
14.4K
Gel
A.R. (3 j)
D
C I M C I
Gel
A.R. (3 j)



Phosphorylations *in vitro* dans les surnageants 100.000 g d'homogénats d'ovocytes.

A - Gels et autoradiographies correspondantes d'électrophorèses de S 100 d'homogénats d'ovocytes en prophase (C) ou en métaphase I (P). Les fractions S 100 ont été incubées avec du γ-^{32}P-ATP en présence (1) ou absence (2) de 0,1 mM/l de calcium libre. K = kilodaltons.

B - Détail du gel de A : protéines de poids moléculaires compris entre 15 et 90 K.

d'ailleurs possible que cette protéine ne soit pas du tout phosphorylée dans les ovocytes en prophase car le léger marquage dans l'autoradiographie des témoins est peut-être dû à la présence de 2% de maturés dans cet échantillon. D'autres protéines, par contre, ne présentent pas d'augmentation de marquage, notamment dans la zone correspondant à 20.000 et 50.000 daltons.

Des résultats identiques sont obtenus lorsque la méiose des ovocytes en prophase est réinitiée par fécondation (planche XV C) ou activation par l'ionophore A 23187 (planche XV D). Les différences observables entre les séries C et D sont dues à l'emploi, en D, de gels plus courts qui donnent une moins bonne résolution. Il faut également signaler que les résultats sont indépendants de la durée du préchargement (1 h, 3 h ou 13 h).

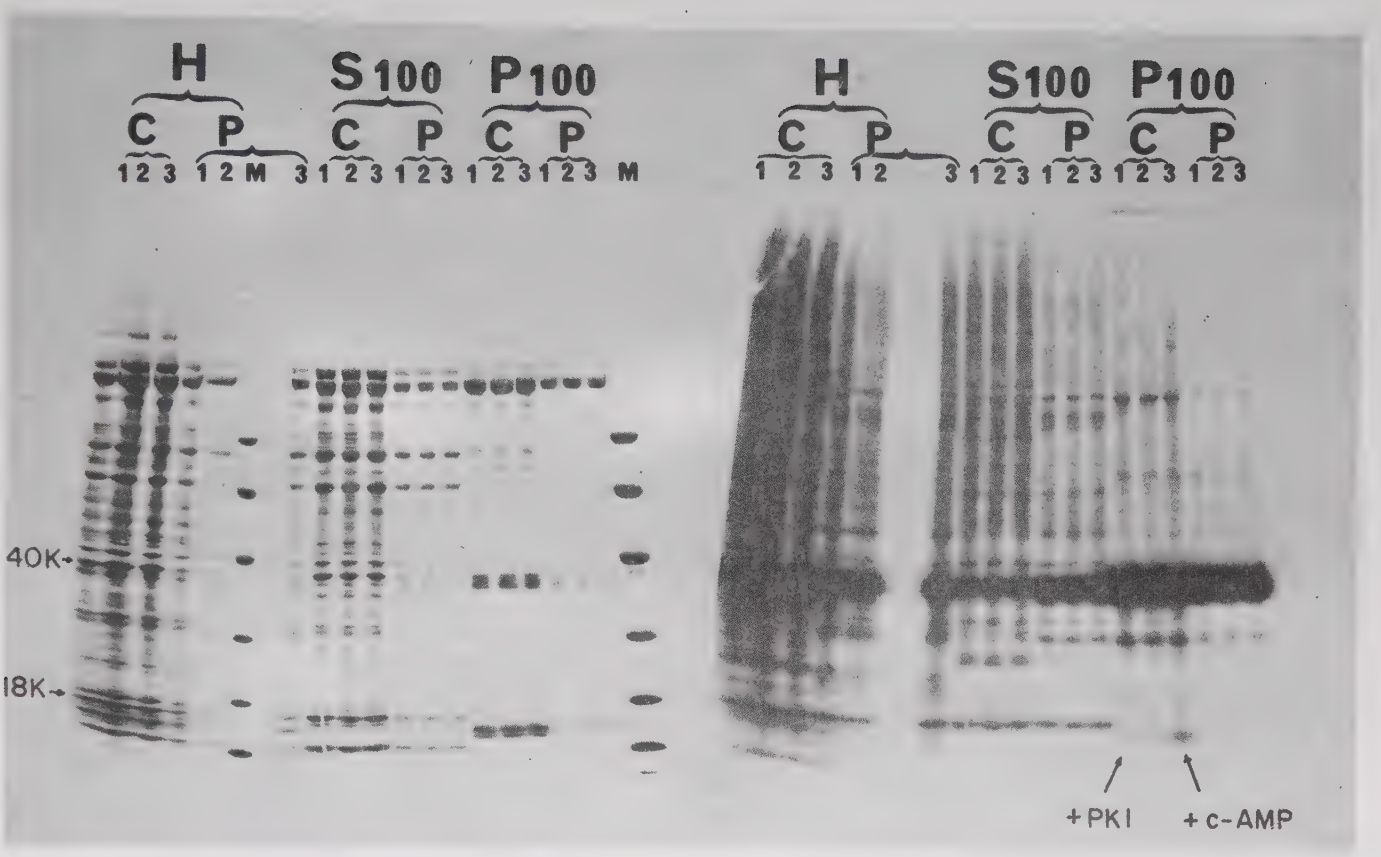
Les expériences "*in vitro*" fournissent des informations supplémentaires sur les modifications de phosphorylation qui se déroulent à la maturation. En effet, de nombreuses protéines deviennent radioactives lorsque du (γ-^{32}P) ATP est ajouté, soit à des homogénats totaux, soit au surnageant 100.000 g (S 100) ou à la fraction solubilisable par détergent du culot 100.000 g (P 100) des homogénats d'ovocytes bloqués en prophase I ou en métaphase I (planche XVI et XVII). On remarque que ce sont généralement les mêmes protéines qui sont marquées *in vivo* et *in vitro* . Ainsi les deux protéines de 38.000 et 40.000 daltons sont également les plus marquées *in vitro*. Le fait qu'elles soient notablement plus abondantes dans le culot que dans le surnageant après centrifugation à 100.000 g (planche XVII) suggère que ce sont des protéines membranaires car il est vraisemblable que tous les organites intracellulaires sont lysés au cours de la congélation-décongélation et homogénéisation. A l'inverse, la protéine de 18.000 daltons semble cytosolique. La planche XVI B montre en outre que la quantité de protéine de 40.000 daltons dans la fraction S 100 diminue à la maturation, alors que c'est l'inverse pour celle de 38.000 daltons.

L'activité protéine-kinase endogène apparait significativement plus forte dans les extraits d'ovocytes maturés que dans ceux de témoins, comme le montrent les planches XVI et XVII. L'augmentation est sensible pour un grand nombre de protéines substrats, dont le couple 38.000-40.000 daltons, dans tous les types d'extraits. Dans la fraction S 100, l'augmentation de marquage de la protéine de 18.000 daltons est nette mais elle est encore plus forte au niveau d'une protéine de 30.000 daltons, tandis qu'on observe une diminution à 26.000 et 100.000 daltons (planche XVI A). D'autre part, la présence ou l'absence (EGTA en excès) de 0,1 mM/l de calcium libre pendant l'incubation ne modifie apparemment pas les résultats (planche XVI A).

Il ne semble pas non plus que les phosphorylations soient modulées par le c-AMP car la planche XVII montre que l'addition aux divers extraits de c-AMP (1,7 µM) ou d'inhibiteur des protéine-kinases c-AMP dépendantes (PKI) (20 nano M) ne modifie pas les résultats. La seule exception possible est une protéine de 16.000 à 17.000 daltons de la fraction "P 100" dont le marquage semble plus fort en présence de c-AMP dans les témoins mais pas dans les maturés.

Les Electrophorèses bidimensionnelles (IEF - SDS) montrent que les protéines de 38.000 et 40.000 daltons existent chacune sous plusieurs formes de point isoélectrique différent, compris entre 4,5 et 4,8 (planche XVIII). La série de 40.000 daltons est visiblement plus acide que celle de 38.000 daltons mais les deux semblent présenter une augmentation de marquage comparable lors de la maturation. De plus, on n'observe pas de translation évidente vers des points isoélectriques plus bas dans ces deux groupes de protéines, à la suite de la maturation, comme cela devrait être le cas si leur niveau de phosphorylation augmentait. Ceci suggère donc que, soit la variabilité des points isoélectriques n'est pas due à des niveaux de phosphorylation différents, soit le pourcentage de chaque forme reste constant durant la maturation. Dans cette hypothèse, l'augmentation d'incorporation de phosphate radioactif serait dûe à un renouvellement plus rapide des phosphates de ces protéines. Une particularité remarquable des ovocytes maturés par protéase est la présence d'une protéine de 50.000 daltons environ et de point isoélectrique 4,6, moyennement phosphorylable, qui ne se retrouve pas dans les témoins ni dans les extraits d'ovocytes activés par l'ionophore ou fécondés. Les électrophorégrammes suggèrent également que ce pourrait être une forme dégradée de la protéine majeure (70.000 daltons, PI 4,8), elle aussi faiblement phosphorylée. Il est toutefois surprenant qu'une modification aussi importante ne soit pas du tout visible dans les électrophorèses unidimensionnelles avec SDS. Comme la "solution d'arrêt" des échantillons destinés aux électrophorèses bidimensionnelles est différente (et qu'il n'y a pas de chauffage à 100° C), on ne peut pas exclure l'hypothèse d'une protéolyse consécutive à l'homogénéisation.

PLANCHE XVII



Gel

Autoradiographie

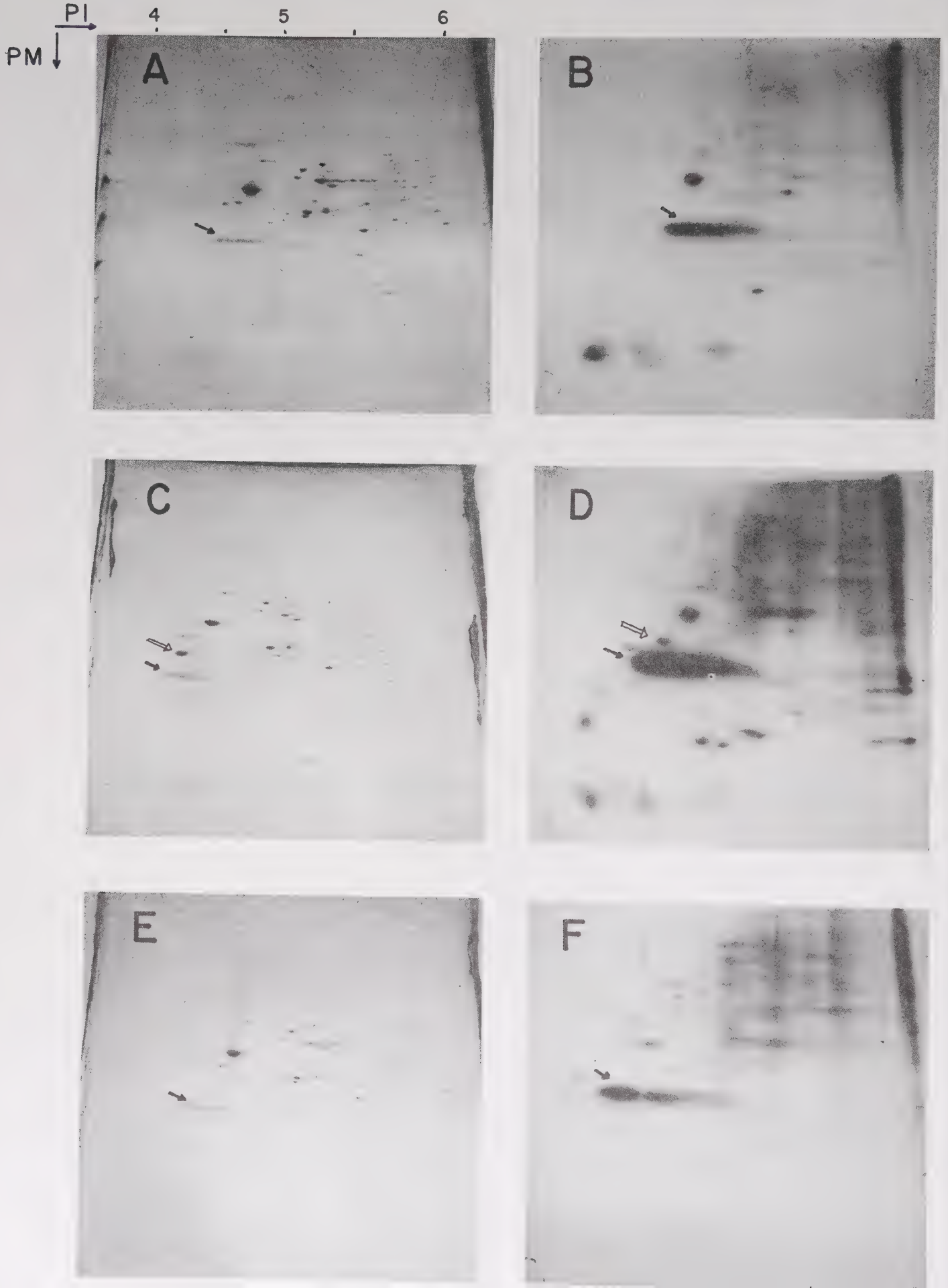
Phosphorylations *in vitro* dans diverses fractions d'homogénats d'ovocytes.

Gel et autoradiographie correspondante d'électrophorèse d'homogénats totaux (H), de surnageant 100.000 g (S 100) ou de culot 100.000 g (P 100) de broyat d'ovocytes en prophase (C) ou en métaphase I (P). Les fractions ont été incubées avec du γ-^{32}P-ATP en absence (2) ou en présence d'inhibiteur des protéines kinases (1) ou bien de c-AMP (3). M, marqueurs de poids moléculaires.

PLANCHE XVIII

Gels

Autoradiographies



Légende de la planche XVIII

Electrophorèses bidimensionnelles d'homogénats d'ovocytes montrant la position de la phosphoprotéine de 40 kilodaltons.

Gels et autoradiographies d'électrophorèses bidimensionnelles (IEF-SDS) d'homogénats totaux d'ovocytes en prophase (A,B) ou en métaphase I après traitement par protéase (C,D) ou ionophore (E,F). Les ovocytes sont préchargés (3 h) avec du ^{32}P, lavés, puis additionnés ou non de protéase CT_2 ($3,4\ 10^{-2}$ u BTEE/ml final) ou d'ionophore A 23187 (10 µM/l final). Ils sont homogénéisés 75 min (A,C) ou 30 min (E) plus tard. Les homogénats sont soumis à focalisation au point isoélectrique (PI) en tube puis à électrophorèse aves SDS sur plaque. Des marqueurs de poids moléculaire (PM) sont également ajoutés au bord de la plaque. Les gels ont été photographiés avant séchage et ne correspondent pas exactement aux autoradiographies. La phosphoprotéine de 40 kilodaltons est indiquée par la flèche noire et en C et D, la flèche blanche indique le spot de phosphoprotéine mentionné dans le texte.

La méthode de CUTTING et ROTH (1973), appliquée aux électrophorèses unidimensionnelles, ne détecte la présence de phosphoprotéines qu'au niveau 38.000-40.000 dalton (plus une bande plus faible à 70.000 daltons), comme le montre la planche XIX A. La comparaison avec la phosvitine de poule, qui contient 30 % de phosphate, indique que ces protéines contiennent une forte quantité de phosphate. La planche XIX B montre en outre qu'il n'y a pas de différence sensible de la quantité de phosphate à ce niveau entre les ovocytes en prophase et les maturés. Il est toutefois discernable qu'à la suite de la maturation, la quantité de phosphate est diminuée au niveau 40.000 daltons et augmentée au niveau 38.000 daltons. Cette expérience montre également que la technique de CUTTING et ROTH permet de mettre facilement en évidence une différence d'un facteur 4 de la quantité de phosphoprotéine (planche XIX B). Ceci implique donc que, malgré une incorporation de phosphates radioactif quatre fois plus forte au niveau 38.000-40.000 daltons après maturation, la quantité totale de phosphate au niveau de ces protéines n'est pas (ou peu) modifiée.

Ce résultat est confirmé par le dosage du phosphate que libèrent les phosphoprotéines de diverses bandes de gel, lors d'une hydrolyse alcaline à à chaud (planche XIX C et D). Ainsi, après électrophorèse d'échantillons équivalents d'ovocytes bloqués en prophase et de maturés, on n'observe, après maturation, dans les bandes de gel équivalents, qu'une faible augmentation de la quantité de phosphate, pas forcément significative d'ailleurs. Comme les trois principales phosphoprotéines détectées sur gel (38.000, 40.000, 70.000 daltons) sont également les plus marquées, il est peu plausible qu'il y ait une grande quantité de phosphoprotéines qui n'incorporent aucune radioactivité pendant le chargement et la maturation. On peut donc en conclure que, pour un grand nombre de phosphoprotéines, le niveau de phosphorylation n'augmente pas en proportion de leur radioactivité à la maturation. Toutefois, comme l'activité spécifique de l'ATP (et autre précurseurs) intracellulaire n'est pas connue, il n'est pas possible de déterminer la part de l'augmentation de radioactivité qui est due au simple remplacement de phosphate non radioactif par du radioactif et celle due à l'incorporation de phosphates supplémentaires.

Légende de la planche XIX

Détection et dosage du phosphate après électrophorèse d'homogénats d'ovocytes.

A - Détection du phosphate sur gel après électrophorèse de phosvitine (10 µg) et d'homogénat d'ovocytes en prophase de *Sabellaria* (H.S.a) (50 µl ≅ 4,5 x 10^4 ovocytes).

B - Détection du phosphate et des protéines après électrophorèse d'homogénats d'ovocytes en prophase (T) et bloqués en métaphase I après traitement par protéase (P). 3 x 10^5 ovocytes par ml d'homogénat dans les deux cas. Les volumes d'échantillon déposés sont indiqués.

C - Fragments des gels et autoradiographies correspondantes d'électrophorèses d'homogénats d'ovocytes en prophase (T) et bloqués en métaphase I après traitement par protéase (P). Les ovocytes sont préchargés en ^{32}P (3 h) et lavés avant initiation de la maturation puis homogénéisés 30 min après. Les bandes de gels sont colorées au bleu de Coomassie, l'autoradiographie est exposée 1 jour.

D - Dosage du phosphate (Pi) et de la radioactivité ( ) dans quatre zones de gels d'électrophorèses. Le reste des mêmes plaques d'électrophorèses qu'en C est découpé en 4 parties correspondant aux protéines de poids moléculaires compris entre 12-35 K, 35-43 K, 43-140 K, et supérieurs à 140 K. Après hydrolyse, le phosphate est dosé et la radioactivité mesurée dans chaque fragment.

A
Phosvitine
Homog.
S. a.
Phosphate
B
T
P
120µl
120µl 30µl
T
P
20µl
20µl
Phosphate
Protéines
C
T
P
T
P
40K
43K
35K
2K
D
Pi
Témoins
Maturés
0
50
100
0
100
200
nanoM Pi
par cm de gel
cpm
par cm de ge

Les résultats précédents ont montré qu'aucune modification qualitative ou quantitative de l'incorporation de phosphate radioactif dans les protéines n'annonce l'établissement du blocage en métaphase I. Par contre, durant les stades ultérieurs de la méiose, on observe des modifications significatives comme le montre la figure 26. Dans les ovocytes bloqués en métaphase I, en effet, le taux d'incorporation continue d'augmenter lentement mais régulièrement, alors que dans ceux activés par l'ionophore A23187, une décroissance de l'incorporation est visible dès l'émission du 1er globule polaire (fig. 26. A). Cette décroissance continue jusqu'à l'achèvement de la méiose, où la radioactivité incorporée a décru de 40 % par rapport à ce qu'elle était au stade métaphase I. Elle réaugmente ensuite, à partir de l'apparition du monoaster.

Lorsque des ovocytes bloqués en métaphase I, à la suite d'un traitement par protéase, sont activés par l'ionophore, on observe également un arrêt puis une décroissance de l'incorporation (fig. 26 B). Cette diminution de l'incorporation de phosphate radioactif n'est pas due à un efflux de phosphate ou de précurseurs marqués, car les expériences témoins montrent qu'il n'y a pas de diminution de la radioactivité totale des ovocytes. Elle n'est pas due non plus à un influx de phosphate non radioactif qui diminuerait l'activité spécifique intracellulaire car l'absorption de phosphate reste aussi faible durant l'achèvement de la méiose qu'en métaphase I. Elle s'observe également sur la figure 26 C, où des ovocytes en prophase d'un même lot sont soit traités par protéase, soit fécondés. La cinétique est toutefois moins claire par suite de l'imprécision des mesures et aussi du moins bon synchronisme des ovocytes fécondés.

Légende de la figure 26

Incorporation de ^{32}P dans les protéines durant l'ensemble de la méiose.

Les ovocytes en prophase sont préchargés en ^{32}P (A et B 2 h 40, C 2 h) et après lavage, la méiose est réinitiée par addition de protéase (Prot), d'ionophore (A 23187) ou de spermatozoïdes lavés (Spz).

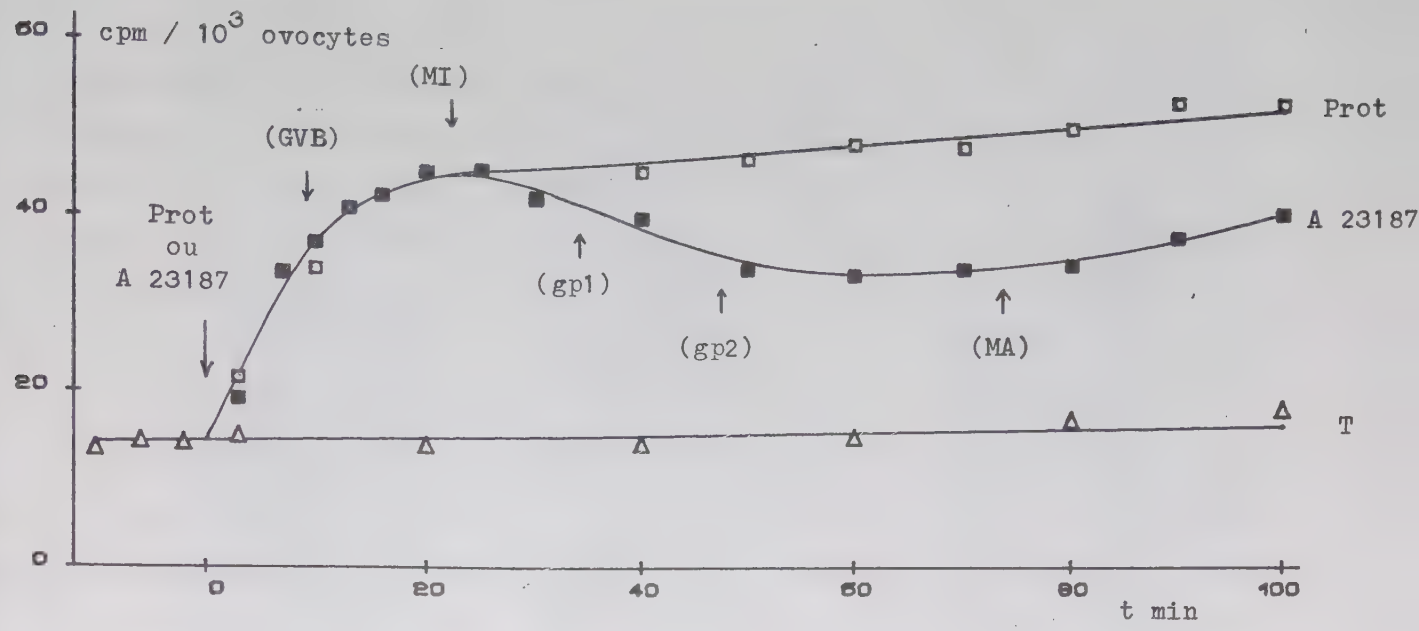
A - Comparaison de l'incorporation de ^{32}P dans les protéines d'ovocytes en prophase additionnés de protéases (○) (CT_2 1,5 10^{-2} u BTEE/ml), d'ionophore (○) (5,8 µM/l final) ou non traités (Δ). Chaque point est la moyenne des mesures faites dans deux expériences identiques.

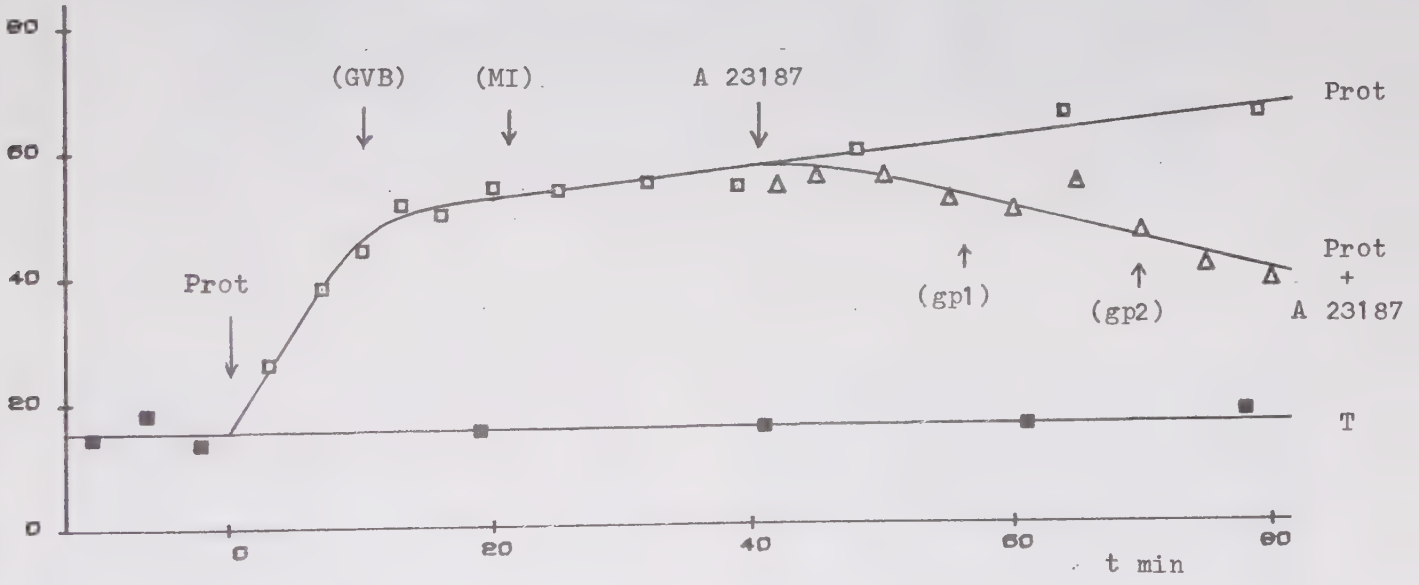
B - Incorporation de ^{32}P dans les protéines d'ovocytes additionnés de protéase (○) (CT_2 1,5 10^{-2} u BTEE/ml), de protéase puis d'ionophore (10 µM/l final) (Δ) ou non traités (○).

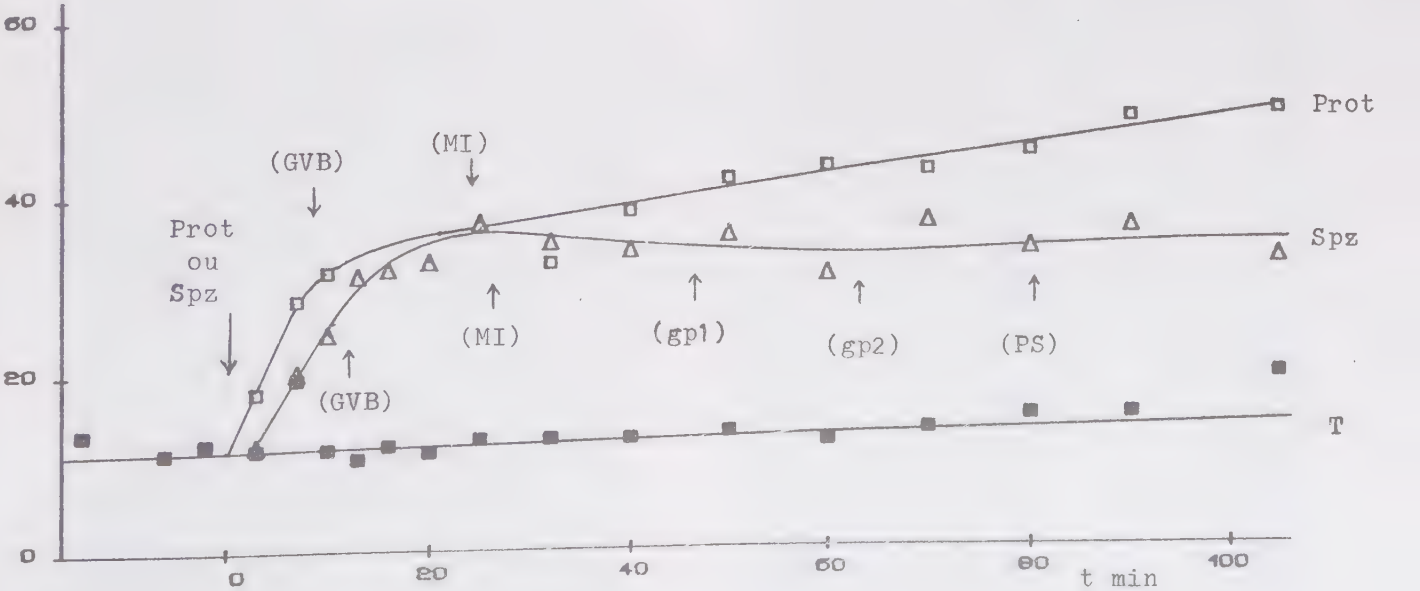
C - Incorporation de ^{32}P dans les protéines d'ovocytes additionnés de protéase (○) (CT_2 1,5 x 10^{-2} u BTEE/ml), de spermatozoïdes (Δ) (10 spz/ml final) ou non traités (○).

Les abréviations entre parenthèses indiquent les temps où 50% des ovocytes atteint un stade donné : GVB, vésicule germinative rompue; MI, métaphase I; gp_1, premier globule polaire émis; gp_2, deuxième globule polaire émis; MA, monoaster; PS, pro-métaphase de 1ère segmentation.

FIGURE 26


cpm / 10^3 ovocytes
(MI)
(GVB)
Prot
ou
A 23187
(gp1)
(gp2)
(MA)
Prot
A 23187
T
t min


(GVB)
(MI)
A 23187
Prot
(gp1)
(gp2)
Prot
+
A 23187
T
t min


(GVB)
(MI)
Prot
ou
Spz
(MI)
(gp1)
(gp2)
(PS)
(GVB)
Prot
Spz
T
t min

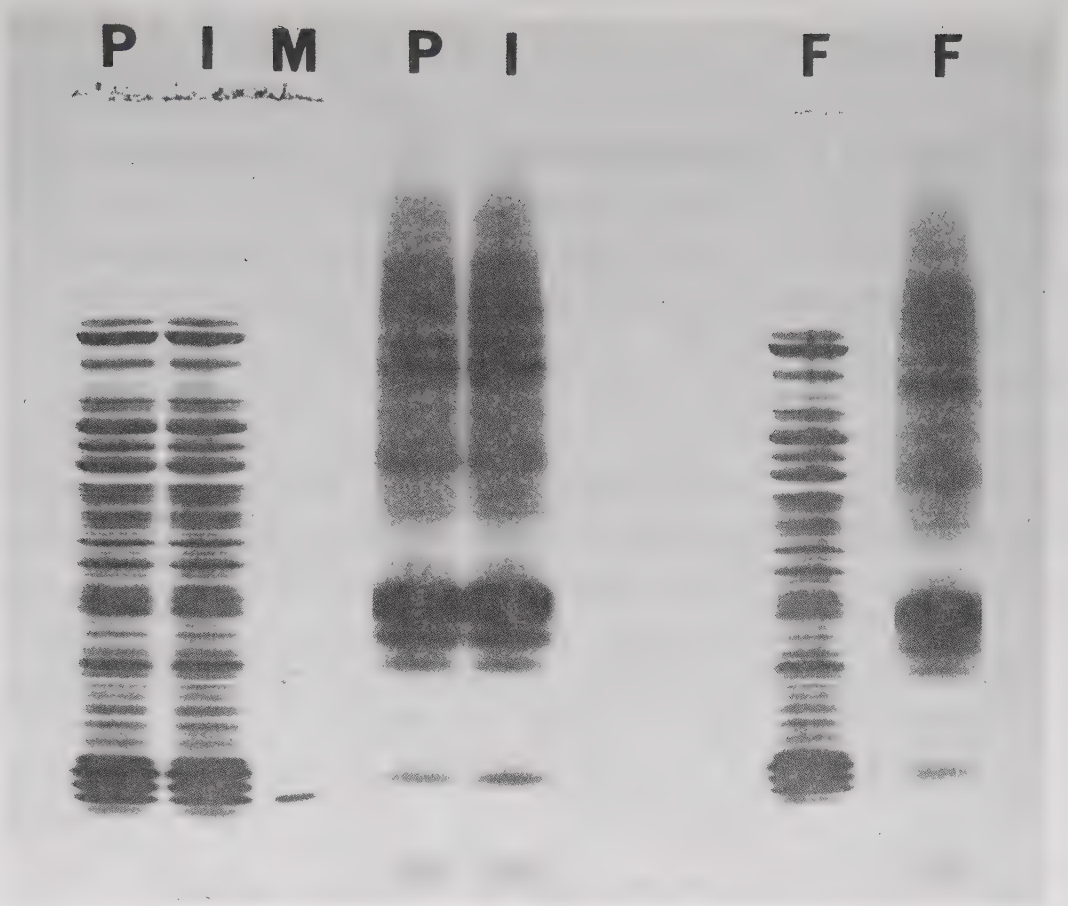
La diminution d'incorporation lors de l'achèvement de la méiose est également visible sur les autoradiographies d'électrophorèses (planche XX). Ainsi, alors qu'il n'y a pas de différence visible entre les ovocytes bloqués en métaphase I et ceux, activés ou fécondés, qui commencent à émettre leur premier globule polaire (planche XX A), il y en a une très apparente à la fin de la méiose (planche XX B). On observe alors que la plupart des phosphoprotéines ont subi une diminution comparable de marquage. La seule exception apparente est la protéine de 18.000 daltons dont la radioactivité est nettement plus réduite que la moyenne, redescendant au niveau de celle de la protéine de 20.000 daltons. Le niveau de marquage de cette protéine de 18.000 daltons semble donc assez caractéristique du stade métaphase I, sans être particulièrement lié au blocage métaphasique, puisqu'il augmente de la même façon lors de la levée du blocage prophasique par protéase que par ionophore (ou fécondation) et ne décroit que bien après la levée du blocage métaphasique.

Légende de la planche XX

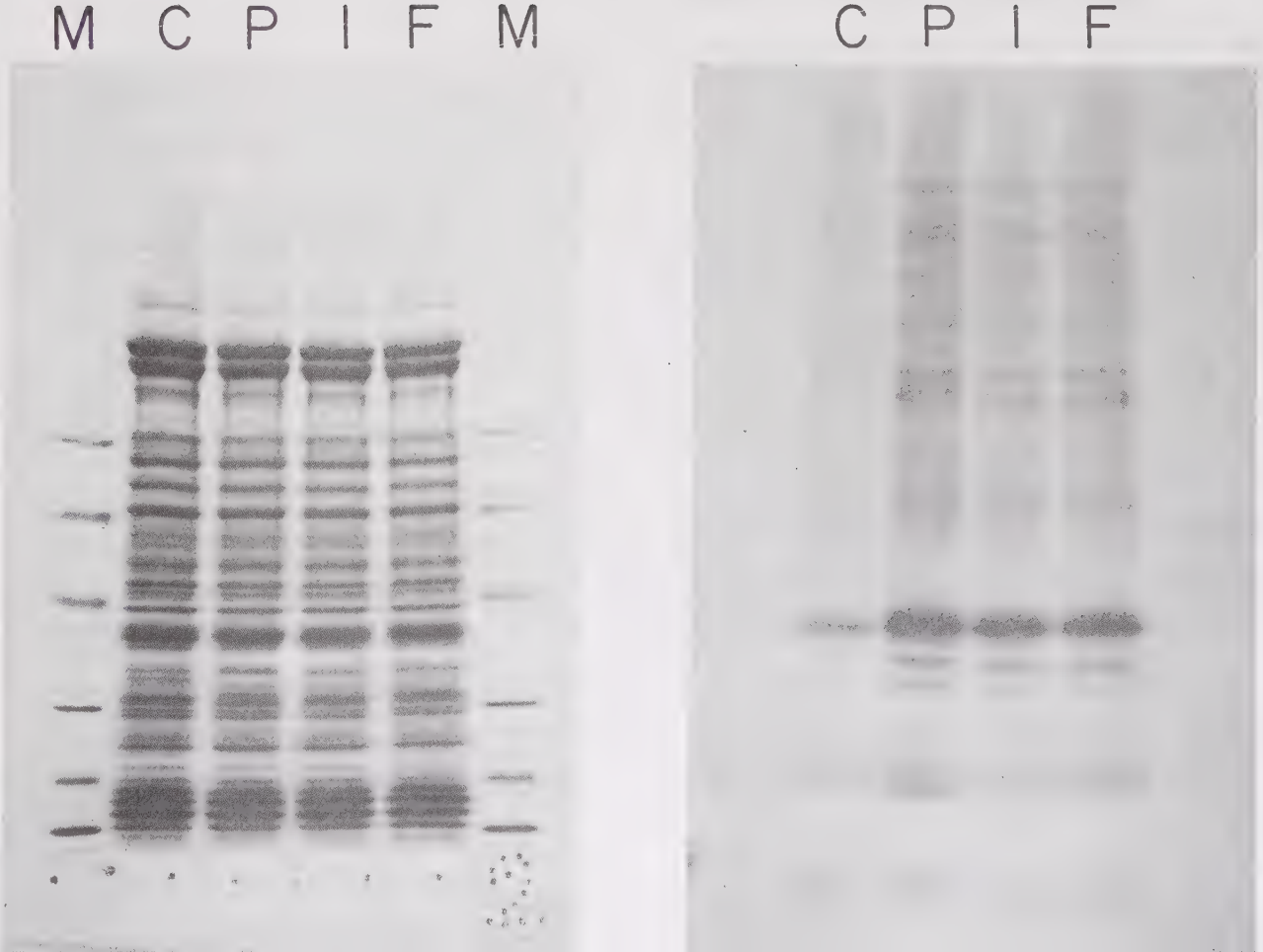
Electrophorèse et autoradiographie d'homogénats d'ovocytes activés, préchargés en ^{32}P.

Après 3 h de préchargement en prophase I et lavage, les ovocytes sont additionnés soit de protéase 3,4 10^{-2} uBTEE/ml final) (P), soit d'ionophore A 23187 (10 µM/l final) (I), soit de spermatozoïdes lavés (10^7 spz/ml final)(F), soit non traités (C). Les ovocytes sont fixés soit 30 min après (A), au début de l'émission du premier globule polaire, soit 75 min après (B), lorsque la méiose est achevée. Les homogénats et les marqueurs de poids moléculaire (M) sont soumis à électrophorèse avec SDS, les gels sont ensuite autoradiographiés.

A



B



Conclusion

On retrouve donc chez *Sabellaria* une augmentation d'incorporation de phosphate radioactif dans les protéines au moment de la maturation, comme chez l'étoile de mer et le Xénope (MASUI *et al.*, 1979). Dans ces trois cas, les cinétiques d'incorporation présentent un plateau analogue après la rupture de la vésicule germinative (MALLER *et al.*, 1977 ; GUERRIER *et al.*, 1977). Ceci confirme donc que la phosphorylation des protéines est un élément important de la levée du blocage prophasique et plus particulièrement des événements conduisant à la rupture de la vésicule germinative et à la formation du premier fuseau de division méiotique. Les expériences sur *Sabellaria* où la maturation est déclenchée par protéase montrent en outre que l'augmentation d'incorporation n'est pas un événement suffisant pour la poursuite de la méiose, au delà du stade métaphase I. Les expériences *"in vitro"* indiquent également que, comme chez l'étoile de mer, les activités protéine-kinases sont stimulées à la maturation (GUERRIER *et al.*, 1977) et indépendante du c-AMP et du calcium (DOREE *et al.*, 1981c).

Dans le détail cependant, les différences entre les trois systèmes sont nombreuses. Ainsi, chez *Sabellaria* comme chez l'étoile de mer, l'augmentation d'incorporation de phosphate radioactif débute pratiquement dès l'addition de l'agent déclenchant la maturation, alors que chez les batraciens elle ne commence que peu avant la rupture de la vésicule germinative (MALLER *et al.*, 1977, BELLE *et al.*, 1979). De même, si dans les trois cas on observe une augmentation comparable de l'incorporation dans de nombreuses protéines, par contre celles qui semblent spécifiquement marquées à la maturation sont très différentes. Ainsi chez *Sabellaria*, c'est une protéine de 18.000 daltons, contre 16.000 et 38.000 daltons chez l'étoile de mer (DOREE, 1981a), qui subit un accroissement de marquage caractéristique, tandis que chez le xénope c'est une diminution d'incorporation au niveau 40.000 daltons qui a été décrite (BELLE *et al.*, 1979).

D'autre part, d'après MALLER *et al.* (1977), il existe chez le xénope, en dehors du vitellus, deux types de phosphoprotéines. Celles qui contiennent le plus de phosphate (17.000 à 25.000 daltons) n'incorporent pas de phosphate radioactif, alors que dans les autres, de poids moléculaire supérieur, le phosphate est renouvellé rapidement. Le phosphate incorporé dans celles ci est donc rapidement (1 h environ) à l'équilibre isotopique avec le phosphate des précurseurs intracellulaires. L'augmentation de marquage de cette

catégorie de phosphoprotéines, à la maturation, doit donc correspondre à une augmentation réelle de leur nombre (par démasquage) ou de leur teneur en phosphate (radioactif ou non). Ceci est d'ailleurs explicitement démontré dans le cas d'une protéine ribosomale dont la migration en électrophorèse bidimensionnelle est modifiée par suite de sa phosphorylation à la maturation (HANOCQ-QUERTIER *et al.*, 1981). Chez *Sabellaria*, par contre, les phosphoprotéines "inertes" du xénope ne semblent pas avoir d'équivalent car les protéines qui contiennent le plus de phosphate sont également les plus marquées dans les ovocytes en prophase et subissent un accroissement de de marquage proportionnel à celui des autres phosphoprotéines à la maturation. Pourtant il est évident, qu'au moins dans le cas des deux principales phosphoprotéines (38.000 et 40.000 daltons), la quantité de phosphate ne varie pas (ou peu) à la maturation. Leur phosphate n'est donc vraisemblablement pas à l'équilibre isotopique avec les précurseurs et l'augmentation d'incorporation de radioactivité à la maturation peut très bien s'expliquer par une simple augmentation de la vitesse d'échange. Il est possible que ces deux phosphoprotéines ne soient qu'un cas particulier et qu'elles n'aient pas un rôle important dans la réinitiation de la méiose. Il semble en tout cas qu'elles ne proviennent pas du vitellus car leurs proportions sont modifiées à la maturation alors que l'ultrastructure des granules vitellins n'est pas changée. On peut aussi envisager que tous leurs phosphates ne soient pas équivalents et que seule une petite fraction particulière soit échangeable. L'augmentation de radioactivité à la maturation s'expliquerait alors, comme chez le Xénope, par une augmentation des phosphates de ce type. La diminution de marquage observée lors de l'achèvement de la méiose ne peut d'ailleurs pas être due à une diminution du taux de renouvellement des phosphates et ne peut s'expliquer que par une diminution réelle du niveau de phosphorylation des protéines.

5 - Autres changements métaboliques lors de la méiose

Divers aspects du métabolisme des ovocytes de *Sabellaria* ont également été sommairement prospectés.

La consommation d'oxygène est significativement accrue lors de la maturation, comme le montre la figure 27, toutefois, à la différence de la libération d'acide, elle ne retourne pas à sa valeur initiale par la suite. L'augmentation de production de gaz carbonique par la respiration n'est donc pas responsable de la libération d'acide. Une augmentation de respiration identique est observée, lorsque la maturation est déclenchée par fécondation ou activation avec l'ionophore A23187. Ces résultats sont donc comparables à ceux obtenus avec les ovocytes de diverses espèces : étoile de mer, oursin, Xénope, rat (MASUI *et al.*, 1979).

Des changements importants dans l'absorption de diverses molécules marquées sont également observés lors de la maturation. Tout comme pour le phosphate, l'absorption d'acides aminés est 10 à 50 fois plus forte dans les ovocytes en prophase que dans les maturés, alors que c'est l'inverse chez *Urechis* (GOULD, 1969). Par contre, l'absorption de thymidine est très faible, sans différence significative entre maturés et non maturés, comme chez d'autres espèces telles que *Pectinaria* (TWEEDELL, 1976) et *Urechis* (BLANKSTEIN *et al.*, 1977).

En autoradiographie, une incorporation notable de thymidine n'est visible qu'à la fin de la méiose, dans les pronuclei des ovocytes fécondés. Par contre, l'incorporation d'uridine est très active dans les ovocytes bloqués en prophase, comme chez *Pectinaria* (TWEEDELL, 1966). Les autoradiographies montrent que le marquage est localisé à la vésicule germinative et est particulièrement intense au niveau du nucléole (Planche XXI, A), tout comme chez *Pectinaria* (TWEEDELL, 1966), *Urechis* (DAS, 1976) et la souris (WASSARMAN *et al.*, 1976). A l'inverse, l'incorporation d'uridine est pratiquement nulle dans les ovocytes maturés. Si les ovocytes sont mis en présence d'uridine avant déclenchement de la maturation, on obtient un marquage final faible et sans répartition spéciale (planche XXI, B). Ceci implique que les

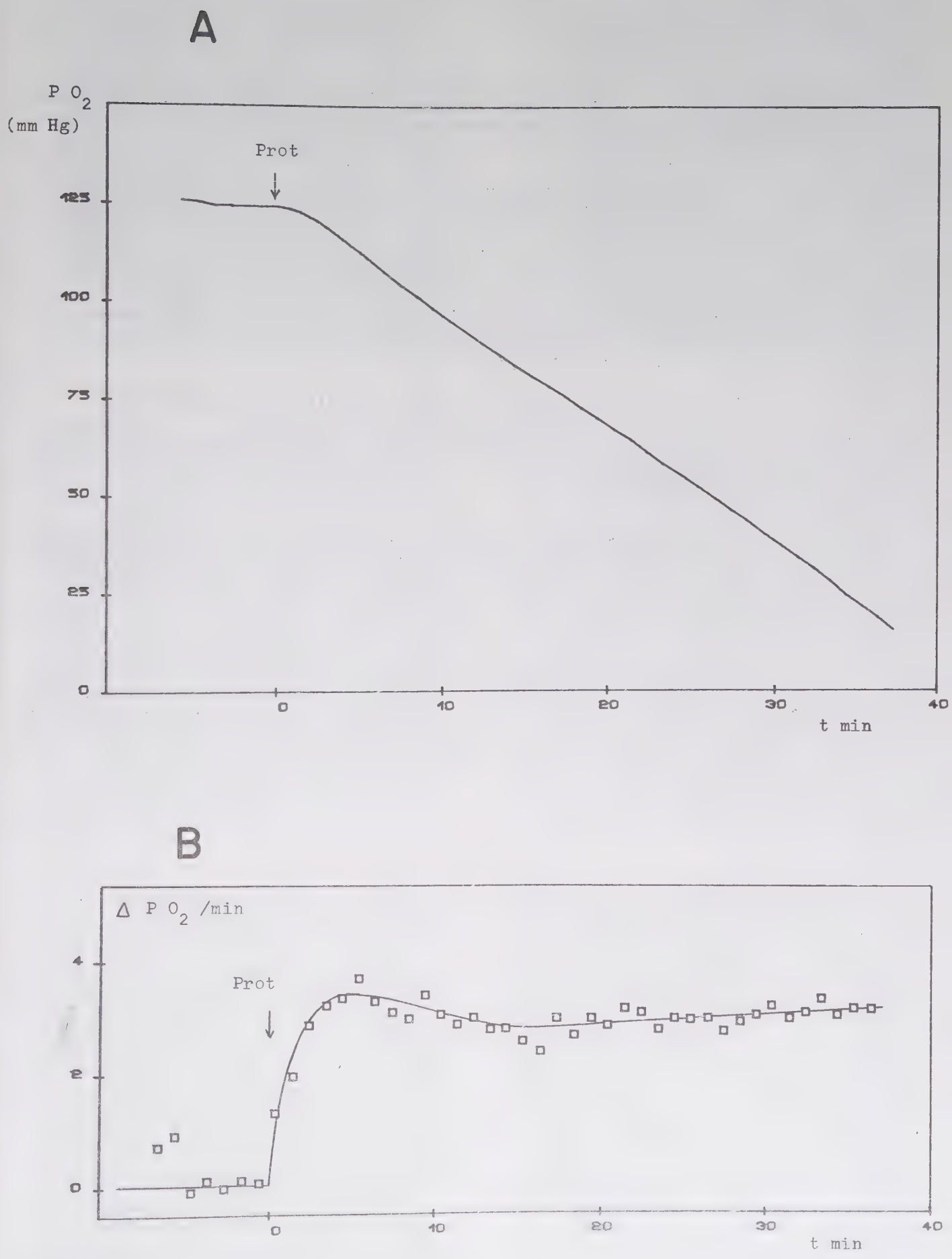
Légende de la figure 27

Mesure de la consommation d'oxygène lors de la maturation d'ovocytes, déclencyée par addition de protéase : 9 ml d'une suspension d'ovocytes en prophase (3% vol/vol) sont mis dans un récipient clos et agités par un barreau magnétique suspendu. La variation de la pression partielle en oxygène est mesurée avec une électrode de Clark et un oxymètre Radiometer. La maturation est déclenchée par addition de 100 µl de protéase CT (0,5 u BTEE/ml).

A - Enregistrement de la pression partielle en oxygène du milieu lors de la maturation.

B - Evolution du taux de consommation d'oxygène par les ovocytes, calculé d'après la courbe A.

FIGURE 27


A
P O2
(mm Hg)
Prot
125
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
t min
B
Δ P O2 /min
4
2
0
Prot
0
10
20
30
40
t min

Légende de la planche XXI

Mise en évidence par autoradiographie de l'incorporation de traceurs radioactifs dans les ovocytes en prophase ou en métaphase I.

Les ovocytes bloqués en prophase sont incubés dans de l'eau de mer artificielle tamponnée contenant 20 µCi/ml de traceur tritié. Une partie de la suspension est ensuite isolée et additionnée de protéases pour déclencher la maturation. A divers temps des ovocytes, maturés ou non, sont fixés au Carnoy, inclus à la paraffine et coupés. Les coupes sont ensuite recouvertes de film pour autoradiographie AR 10 (Kodak). Après divers temps d'exposition, le film est révélé et les coupes sont colorées au vert de méthyle pyronine.

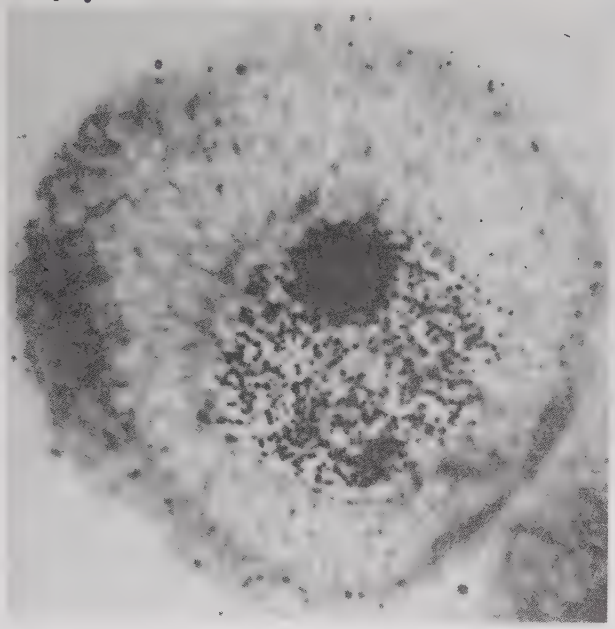
A et B - Incorporation d'uridine ^{3}H-5 (CEA) (10 Ci/mM) dans les ovocytes en prophase (A) (6 h d'incubation) et maturés (B) (1 h 25 d'incubation dont 35 min avec protéase); 34 jours d'exposition.

C et D - Incorporation de L-Lysine ^{3}H-3,4,5 (CEA) (22 Ci/mM) dans les ovocytes en prophase (C) (30 min d'incubation) et maturés (D) (1 h 30 d'incubation dont 1 h avec protéase); 19 jours d'exposition.

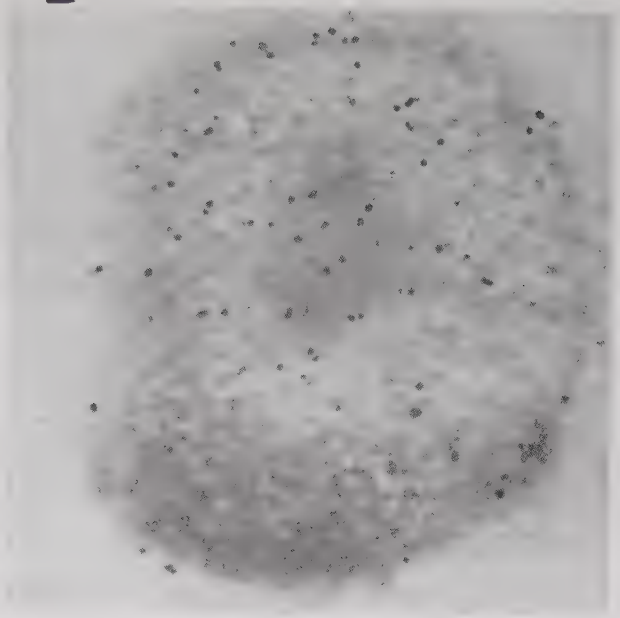
E et F : incorporation de L-Leucine ^{3}H-3,4,5 (CEA) (1 Ci/mM) dans les ovocytes en prophase (E) (7 h 25 d'incubation) et maturés (D) (1 h 30 d'incubation dont 1 h avec protéase); 4 jours d'exposition.

Microscopie optique; x 1.700

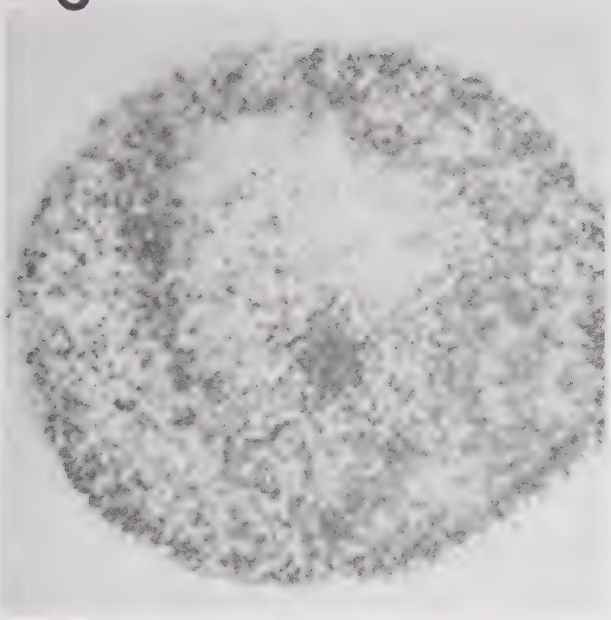
A



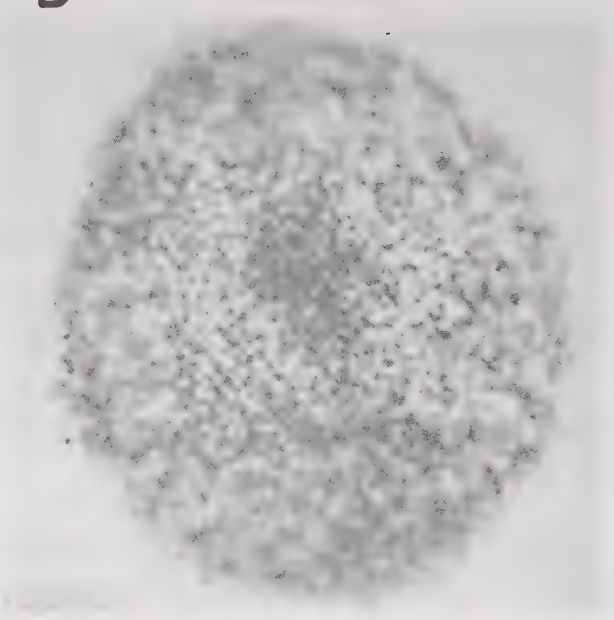
B



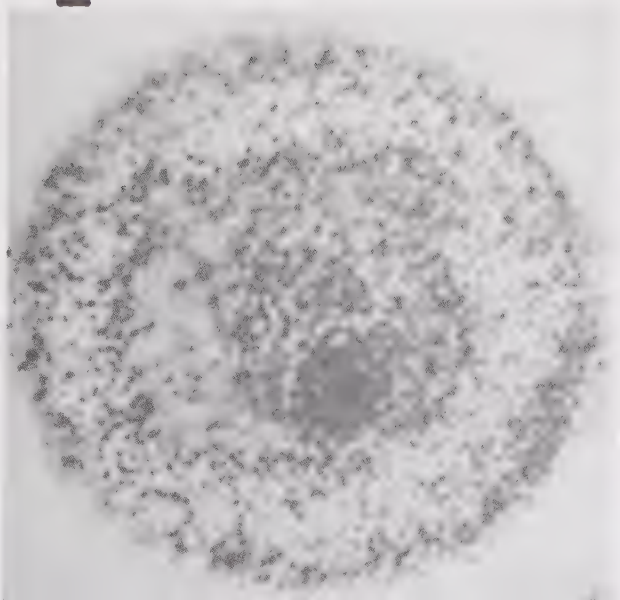
C



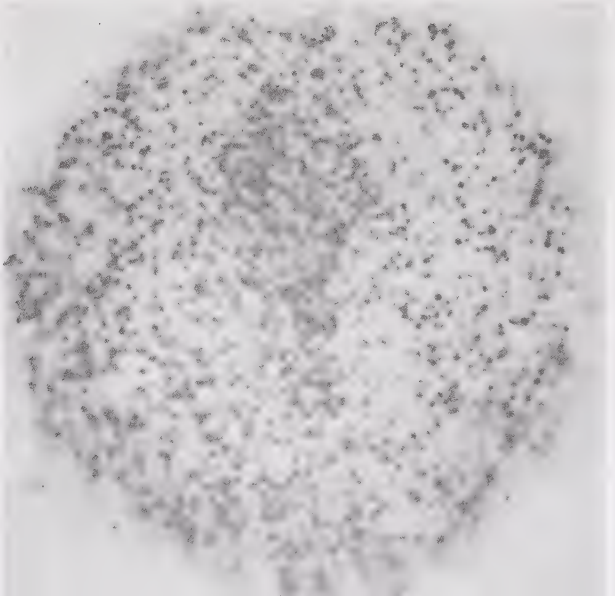
D



E



F



ARN synthétisés dans le nucléole, et la vésicule germinative des ovocytes pendant la prophase sont ensuite dispersés dans le cytoplasme. Une diminution similaire de la synthèse d'ARN à la maturation a également été décrite chez diverses espèces de vertébrés et d'invertébrés (MASUI *et al.*, 1979).

La synthèse protéique a également été étudiée par autoradiographie et mesure de scintillation liquide. Comme le montre la figure 28 A, elle est assez active dans les ovocytes en prophase et n'est pas modifiée lorsque la maturation est déclenchée par addition de protéase. Il en est de même lorsque les ovocytes en prophase sont activés par l'ionophore A23187 (figure 28, B). Toutefois, alors que les ovocytes activés conservent une synthèse protéique comparable à celle des témoins, au moins jusqu'à achèvement de la méiose et formation du monoaster, dans ceux traités par protéase, elle cesse presque totalement 20 min après blocage en métaphase I (figure 28 B). Ce résultat ne peut être attribué à des différences de perméabilité au traceur radioactif, puisque dans ces expériences, il n'est présent dans le milieu que pendant le préchargement en prophase I. Il a de plus été vérifié que la quantité totale de radioactivité absorbée était identique dans les trois lots d'ovocytes à la fin de l'expérience. Par contre, le ralentissement progressif de l'incorporation dans les ovocytes témoins et activés est probablement du à la diminution du stock de précurseur radioactif car, à la fin de l'expérience, 40 à 50 % de la radioactivité initiale est incorporée dans les protéines.

En autoradiographie, après incubation continue avec les acides aminés radioactifs, on observe un marquage très important dans les ovocytes en prophase (planche XXI, C et E) et très faible dans les maturés, du fait de la différence d'absorption. La radioactivité est répartie dans l'ensemble de l'ovocyte avec une prédominance nette au niveau du nucléole. Après des incubations de plusieurs heures, le marquage est significativement plus important au niveau de la vésicule germinative que dans le cytoplasme (Planche XXI, E). Les ovocytes dont la maturation est déclenchée 30 min après addition d'acide aminé radioactif ont un marquage modéré et visiblement plus important au niveau de la zone du fuseau, fortement pyrénophile (Planche XXI, D et F).

Légende de la figure 28

Mesure de la synthèse protéique globale des ovocytes lors de la réinitiation de la méiose par protéase ou ionophore.

Les ovocytes en prophase (10% de maturation en A, 0,4% en B) sont incubés pendant 22 min en présence d'une concentration finale de 1,6 µCi/ml (A) ou 1,2 µCi/ml (B) de DL-Valine ^{14}C-4 (39 mCi/ml) (CEA). Après lavage les ovocytes sont répartis en lots identiques contenant 1,3 x 10^5 ovocytes/ml puis additionnés ou non de protéase ou d'ionophore. A différents temps, 1 ml de suspension d'ovocyte est injectée dans 4 ml de TCA 12,5% et laissés 15 h à 0°C. Après 4 lavages avec du TCA 10% le culot d'ovocytes est dissous par 1 ml de NaOH pendant 15 min à 20°C puis additionné de 10 ml d'Instagel. La radioactivité est ensuite mesurée par scintillation liquide.

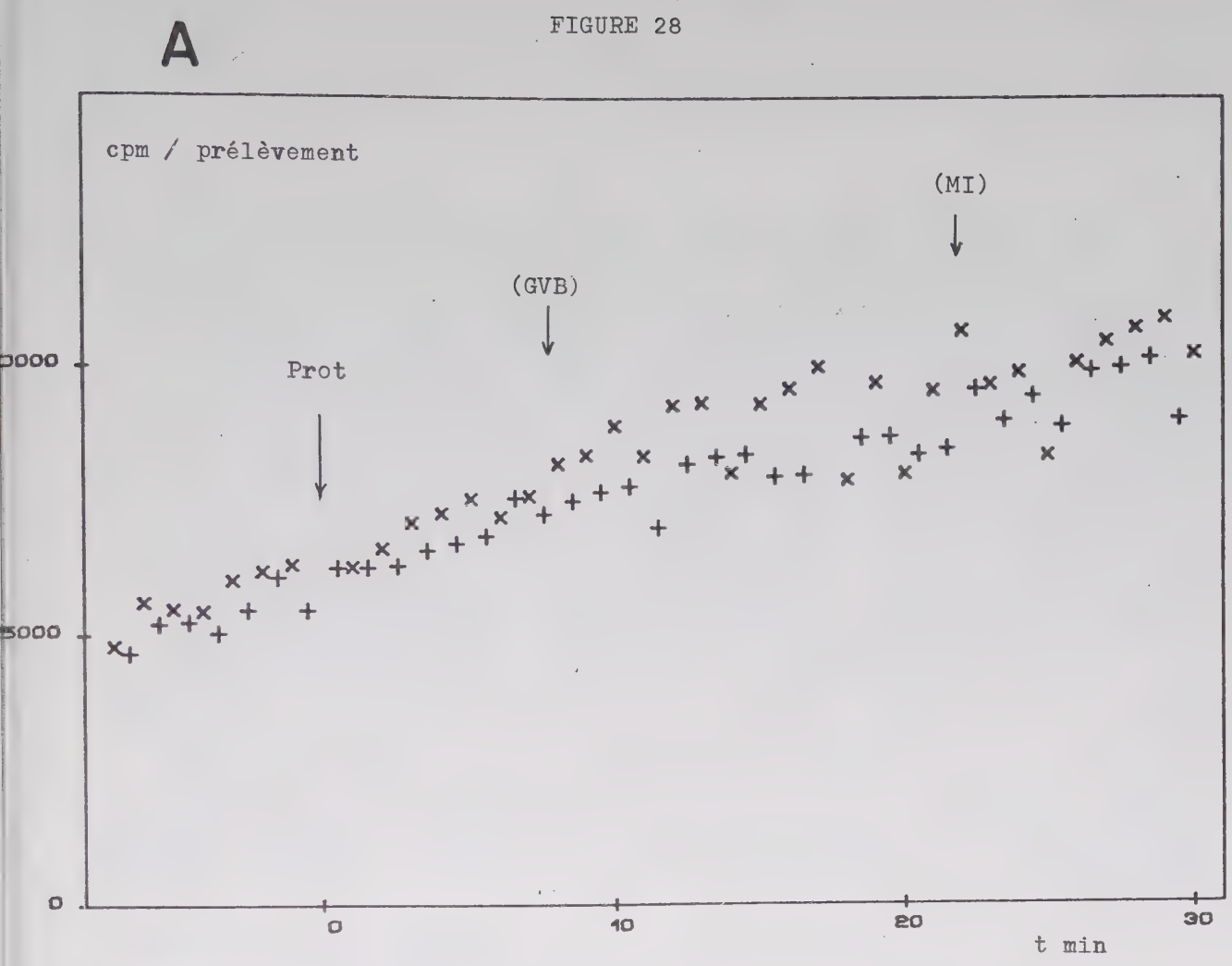
A - Ovocytes maturés (x) ou non (+) par addition de 100 µl de protéase CT_2 (6 u BTEE/ml) à 50 ml de suspension.

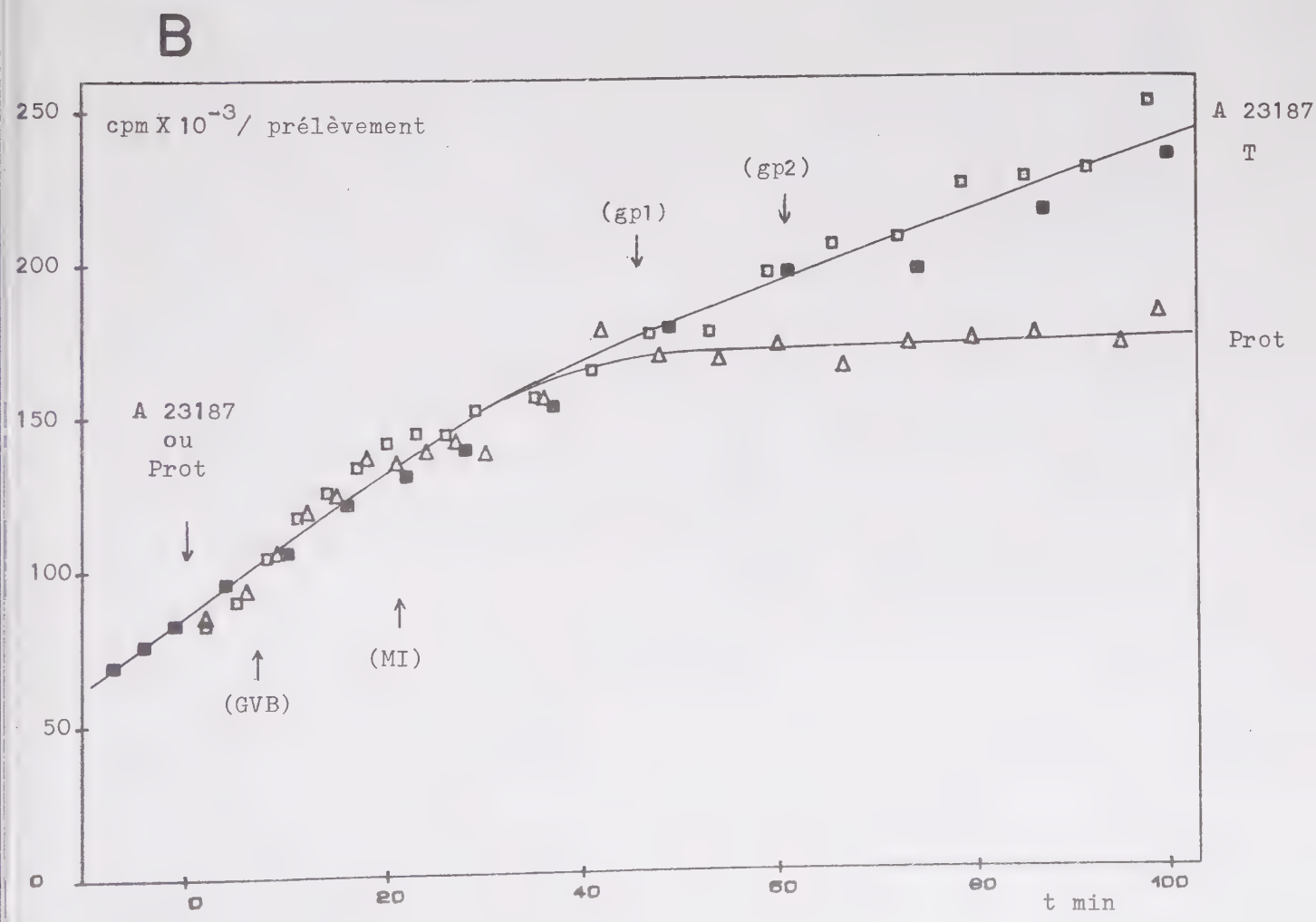
B - Ovocytes non traités (■) ou maturés par addition de 60 µl de protéase CT_2 (Δ) ou activés par addition de 300 µl d'ionophore A 23187 (□) (1 mM/l dans le méthanol) à 30 ml de suspension.

L'évolution cytologique des ovocytes est déterminée à partir d'aliquotes fixées au carnoy et colorés au carmin acétique. Les abréviations entre parenthèses indiquent les temps où 50% des ovocytes ont atteint un stade donné :

GVB, vésicule germinative rompue; MI, métaphase I; gp_1, premier globule polaire émis ; gp_2, deuxième globule polaire émis.

FIGURE 28


A
cpm / prélèvement
(MI)
(GVB)
Prot
5000
0
0
10
20
30
t min


B
250
200
150
100
50
0
cpm X 10⁻³ / prélèvement
A 23187
T
Prot
(gp2)
(gp1)
A 23187
ou
Prot
(GVB)
(MI)
0
20
40
60
80
100
t min

Ces résultats contrastent avec l'évolution de la synthèse protéique au cours de la méiose qui a été décrite chez diverses autres espèces. En effet, aussi bien chez les invertébrés (*Urechis*, *Spisula*, étoile de mer), que chez les vertébrés, on observe généralement une augmentation de la synthèse protéique, d'au moins un facteur 2, au cours de la maturation (MASUI *et al.*, 1979). Cette augmentation débute presque toujours au moment de la rupture de la vésicule germinative ce qui suggère que le surcroit de synthèse est surtout utile pour la suite de la méiose. Toutefois, chez *Urechis*, sous l'action de la trypsine, les ovocytes réinitient et achèvent la méiose sans qu'il y ait forcément augmentation de la synthèse protéique (BLANKSTEIN *et al.*, 1977). De même, chez *Sabellaria*, l'expérience d'activation par ionophore montre qu'une stimulation de la synthèse n'est pas nécessaire à l'achèvement de la méiose et à la formation du monoaster. Il a été montré par ailleurs que dans cette espèce, il faut attendre la 3ème division de segmentation pour observer une stimulation importante de la synthèse protéique (GUERRIER, *et al.*, 1974).

Une autre caractéristique des ovocytes de *Sabellaria* est leur insensibilité à la cycloheximide. Cet inhibiteur de la synthèse protéique, s'est avéré efficace, à des degrés variables il est vrai, sur les ovocytes de la plupart des espèces testées, où il bloque la méiose. Son action est plus immédiate chez les vertébrés où la rupture de la vésicule germinative est inhibée, que chez les invertébrés où le blocage n'intervient qu'après. Chez *Sabellaria*, aucune réduction significative de la synthèse d'ovocytes en prophase n'est visible après 1 h 15 de traitement continu à 300 µg/ml de cycloheximide (BDH). La même concentration n'inhibe pas non plus la méiose déclenchée par addition d'ionophore (30 min après le début du traitement). Il existe toutefois d'autres exceptions, comme *Urechis* et le chaetoptère, où la cycloheximide, bien qu'inhibant la synthèse protéique, n'empêche pas l'achèvement de la méiose (BLANKSTEIN *et al.*, 1977) et même, chez le chaetoptère, l'accélère et déclenche la différentiation sans clivage (ZAMPETTI-BOSSELER *et al.*, 1973).

Il ne semble donc pas que le taux de synthèse protéique joue un rôle primordial dans le contrôle de la maturation chez *Sabellaria*. De même, l'arrêt de la synthèse protéique dans les ovocytes bloqués en métaphase I après traitement par protéase est plus vraisemblablement une conséquence qu'une cause du blocage, vu le délai qui les sépare. Toutefois, il est fort probable que ce ne sont pas exactement les mêmes protéines qui sont synthétisées dans les ovocytes en maturation et dans ceux bloqués en prophase, comme cela a été démontré chez divers vertébrés (MASUI *et al.*, 1979). Le marquage préférentiel du fuseau des ovocytes maturés en est peut être un indice, bien que cette relative spécificité ne soit pas apparente chez *Urechis* (DAS, 1976).

CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus sur *Sabellaria alveolata* ont comme principal intérêt d'illustrer la variabilité dans le règne animal, des processus impliqués dans la réinitiation de la méiose et l'activation.

Ainsi, au niveau ultrastructural, *Sabellaria* fournit un exemple où la fécondation reste possible après une réaction corticale apparemment classique. Il semble que ce soit la seule exception connue à la règle générale selon laquelle la réaction corticale est responsable du blocage définitif de la polyspermie. La rupture de l'enveloppe nucléaire présente également l'originalité de ne pas être accompagnée de la disparition des pores nucléaires. La présence d'asters avec centrioles dans le fuseau méiotique indique que c'est sans doute une différence caractéristique entre la plupart des invertébrés et les vertébrés.

Sabellaria est également un cas intéressant de réinitiation de la méiose sans contrôle hormonal et avec un second blocage en métaphase I. Bien que l'intervention des protéases reste hypothétique dans les conditions naturelles, leur spécificité est indéniable quoique inexpliquée. Du point de vue biochimique, il ne semble d'ailleurs pas que des protéases analogues à celles du type CT de *Sabellaria* aient été décrites chez d'autres animaux. Trop peu d'espèces ont été étudiées en détail pour qu'on puisse présumer de la généralité de ce système de levée de blocage et *Sabellaria* est actuellement le seul cas connu. De toute façon, il ne doit pas être très répandu car les ovocytes des trois autres espèces essayées (xénope, étoile de mer, arénicole) sont insensibles aux protéases de *Sabellaria*. La protéine membranaire cible n'est donc pas un constituant immuable de la membrane cytoplasmique.

Sabellaria fournit néanmoins un exemple d'activation cellulaire par protéolyse de la membrane cytoplasmique qui semble moins équivoque que des expériences similaires sur cellules en culture (P. A. JOHNSON *et al.*, 1981). Il confirme l'importance que peut y avoir la perméabilité sodique, alors que dans les études de la réinitiation de la méiose, l'attention est souvent focalisée seulement sur le calcium. Il est certes évident que le calcium a,

chez *Sabellaria*, comme dans la plupart des autres systèmes cellulaires étudiés, un rôle important, quoique difficile à préciser. Les résultats obtenus semblent néanmoins confirmer qu'un influx de calcium n'est nécessaire que chez les espèces, comme *Urechis* et *Spisula*, où la fécondation a normalement lieu en prophase. Une autre originalité de *Sabellaria* est l'existence d'une libération d'acide à la maturation, qui est susceptible d'entraîner une augmentation du pH intracellulaire. Comme on n'observe pas de modification du taux de synthèse protéique, cela amène à douter de la généralité des relations entre ces deux facteurs. Par contre, les modifications de phosphorylations observées semblent confirmer le rôle clé de ce processus dans la réinitiation de la méiose et montrent qu'il n'est pas limité aux systèmes sous contrôle hormonal.

Les résultats obtenus sont évidemment trop fragmentaires pour proposer une interprétation cohérente des processus de la réinitiation méiotique chez *Sabellaria*. Cela est dû notamment au fait que la préparation de quantités importantes d'ovocytes bloqués en prophase est laborieuse et aussi aux difficultés rencontrées lors des essais de microinjections et de mesures électrophysiologiques. En effet, la résistance de la membrane vitelline empêche la pénétration des micropipettes et les ovocytes dénudés sont difficilement manipulables, de plus le cytoplasme est visqueux et riche en vitellus. On ne peut donc avancer qu'une suite d'hypothèses, par comparaison avec les systèmes mieux connus que sont l'étoile de mer et les batraciens. Un schéma plausible est que l'effet initial des protéases est un influx de sodium augmentant significativement sa concentration intracellulaire. Ceci modifierait soit le niveau de calcium libre intracellulaire, soit sa répartition, avec notamment pour conséquence la réaction corticale. A ce stade, le nombre de paramètres modifiés par toutes sortes d'interrelations doit certainement être très élevé : pH intracellulaire, transports actifs et passifs membranaires, respiration, pour ne citer que ceux qui ont été partiellement étudiés. De certaines de ces modifications résultent les changements de phosphorylation qui suggèrent l'apparition d'un facteur comparable au MPF des autres espèces, qui serait responsable du passage en métaphase I. Pour les raisons invoquées précédemment, il n'a en effet pas

été possible de pratiquer les expériences de transfert de cytoplasme qui permettent de prouver l'existence de MPF. Toutefois, s'il est vraisemblable qu'il y a effectivement apparition de MPF chez *Sabellaria*, rien n'indique, à priori, que le calcium ou le c-AMP y soient impliqués.

Les données de base fournies par le présent travail montrent les possibilités offertes par le système *Sabellaria* pour des recherches ultérieures. La singularité qui semble la plus prometteuse est sans doute l'existence du second blocage en métaphaseI . Ainsi, selon le stimulus employé pour lever le blocage prophasique, on peut, chez *Sabellaria*, ne déclencher que les processus impliqués dans la transition prophase-métaphase ou aussi ceux nécessaires pour l'achèvement de la méiose. Cela a permis notamment de montrer que l'augmentation de l'incorporation de phosphate dans les protéines est corrélée avec le passage en métaphase alors que la poursuite de la méiose est au contraire liée à des déphosphorylations. D'autre part, bien que l'établissement du blocage métaphasique n'ait pas été spécialement étudié ici, les résultats obtenus fournissent déjà quelques indications. Ainsi, une action directe sur le calcium intracellulaire au moyen de l'ionophore A23187 empêche ou lève le blocage métaphasique. Par contre, dans les divers processus physiologiques étudiés, on ne note, lors de la réinitiation de la méiose, aucune particularité annonçant le blocage métaphasique. En effet, l'arrêt de la synthèse protéique, par exemple, n'est visiblement qu'une conséquence du blocage. Rien ne prouve, à priori,, qu'il y ait chez *Sabellaria*, apparition d'un facteur cytostatique,comparable à celui mis en évidence chez les amphibiens. Néanmoins, si cela était le cas, les indications recueillies permettent de limiter les sites d'action envisageables pour un tel facteur. C'est peut être là un domaine où l'ovocyte de *Sabellaria* pourrait s'avérer particulièrement utile.

ANNEXE 1

BIOCHIMIE, 1976, 58, 1273-1276.

Mise en évidence d'un comportement anormal de diverses enzymes protéolytiques en filtration sur gel de polyacrylamide-agarose.

Gérard Peaucellier.
Station Biologique, 29211 Roscoff (France).

(19-2-1976).

L'utilisation comparative de deux gels commerciaux en vue de séparer par chromatographie d'exclusion les protéases digestives d'un annélide, a fait apparaître des différences considérables entre un gel de dextranes (Sephadex) couramment utilisé et un gel d'acrylamide-agarose (Ultrogel) nouvellement commercialisé. De nombreuses études ont montré que le volume d'élution des macromolécules en filtration sur gel de dextranes, de polyacrylamide ou d'agarose est fonction de leur taille et avec une assez bonne approximation de leur poids moléculaire [1]. Des propriétés similaires ayant été décrites pour les gels d'acrylamide-agarose [2], l'anomalie constatée a donc conduit à examiner le comportement chromatographique sur ce gel de diverses protéases purifiées du commerce ainsi que de quelques protéines utilisées fréquemment comme étalons.

MATERIEL ET METHODES.

Les expériences de chromatographie d'exclusion sur colonne ont été faites selon la méthode d'Andrew [3], sur une colonne de Sephadex G 75 superfine (Pharmacia lot n° 2165) 1,6 × 40 cm et une colonne d'Ultrogel ACA 54 (L.K.B./Industrie Biologique Française) 1,6 × 70 cm, éluées par un tampon Tris-HCl pH 8, 0,05 M contenant 0,1 M de KCl avec un débit de 7 ml/h dans une enceinte réfrigérée à 4°C. Les échantillons, contenant 2 à 8 mg de protéine diluée dans 0,5 ml de tampon, ont été additionnés de 0,2 g de saccharose et de 0,25 mg de Bleu Dextran 2000. Pour éviter l'autolyse, les protéases ont été préalablement inactivées par traitement au Phénylméthane Sulfonyl Fluorure (P.M.S.F.). Les volumes d'élution ont été mesurés directement sur l'enregistrement de la DO_{280} de l'effluent de la colonne, sauf pour les protéases de *Sabellaria* et la trypsine, qui ont été détectées par mesure de l'activité estérolytique selon le procédé de Hummel [4], le traitement au P.M.S.F. ayant été naturellement omis dans ces cas-là. Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide (10 p. cent en acrylamide) en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (S.D.S.) et de mercaptoéthanol ont été effectués selon la méthode de Weber *et al.* [5]. L'acétylation des protéases par l'anhydride acétique effectuée selon le processus de Sharma *et al.* [6], a été suivie d'un dessalage sur Sephadex G 25 et d'une concentration par ultrafiltration (UM 2 Amicon) et le cas échéant, les résidus tyrosine ont été déacétylés par l'hydroxylamine 0,5 M [7].

RESULTATS.

L'examen des courbes de sélectivité moléculaire du Sephadex G 75 (fig. 1) et de l'Ultrogel (fig. 2) montre que dans les deux cas les protéines non protéolytiques se répartissent de façon satisfaisante selon une droite lorsque le logarithme de leur poids moléculaire est porté en abscisse et le rapport de leur volume d'élution à celui du Bleu Dextran en ordonnée, comme en témoignent les coefficients de corrélation : $r = -0{,}996$ pour le Sephadex ; $r = -0{,}988$ pour l'Ultrogel. Par contre, les protéases présentent un comportement très différent puisque sur Sephadex la trypsine et l'α-chymotrypsine ont un volume d'élution relatif conforme à leur poids moléculaire, alors que sur Ultrogel,

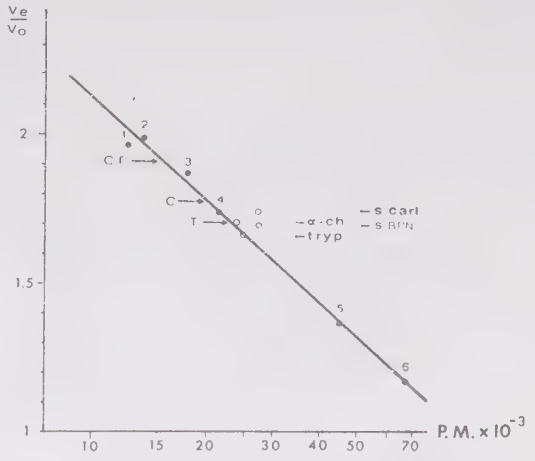


Fig. 1. — *Relation entre le volume d'élution des protéines sur Sephadex G 75 superfine et leur poids moléculaire.*

En abscisse : poids moléculaire (Daltons) d'après l'analyse de la séquence des acides aminés.

En ordonnée : rapport entre le volume d'élution de la protéine (Ve) et le volume vide (assimilé au volume d'élution du Bleu Dextran 2000 Vo).

● marqueurs utilisés pour le calcul de la droite de régression : cytochrome C de cœur de cheval (1), ribonucléase A de pancréas de bœuf (2), myoglobine de baleine (3), inhibiteur de la trypsine extrait des graines de Soja (4), ovalbumine (5), serumalbumine de bœuf (6).

○ enzymes protéolytiques (non utilisées pour le calcul de la droite de régression) : α-chymotrypsine A de bœuf (α-ch), trypsine de bœuf (tryp), subtilisine Carlsberg (s. Carl), subtilisine BPN' (s. BPN').

Les flèches indiquent le volume d'élution relatif des protéases de *Sabellaria* (T, C, CT).

l'α-chymotrypsine est modérément mais significativement retardée tandis que la trypsine a un volume d'élution considérable et son profil d'élution à 280 nm

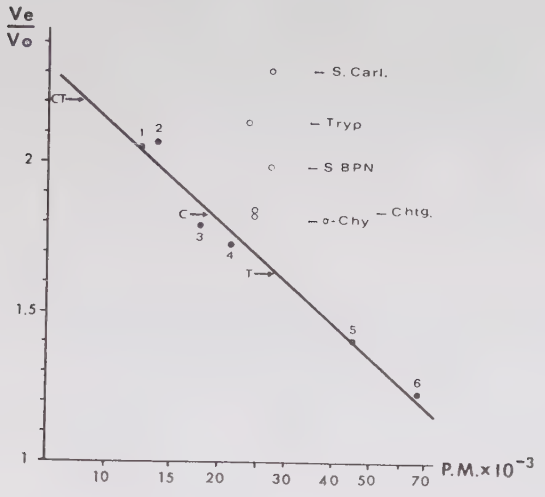


FIG. 2. — *Relation entre le volume d'élution des protéines sur Ultrogel ACA 54 et leur poids moléculaire.*

Mêmes légendes que pour la figure 1 sauf Chtg = chymotrypsinogène A de bœuf.

montre 2 à 3 pics partiellement séparés et d'importance variable. De même, les subtilisines qui présentent déjà une tendance (significative pour la s. Carlsberg) à être retardées sur Sephadex ont un comportement aberrant sur Ultrogel puisque le volume d'élution relatif trouvé pour la subtilisine Carlsberg est le double de la valeur prévisible d'après son poids moléculaire. Pour toutes ces enzymes, les volumes d'élution restent les mêmes, qu'il y ait eu ou non inactivation préalable de l'activité enzymatique par le P.M.S.F. Sur les graphiques sont également indiqués les volumes d'élution des trois protéases (T, C et CT) trouvées dans le suc digestif de l'annélide polychète *Sabellaria alveolata* [8] qui sont voisins sur Sephadex mais très différents sur Ultrogel, ce qui a d'ailleurs permis leur séparation.

A titre de vérification, les mêmes échantillons, sauf les protéases de *Sabellaria* pas encore assez purifiées, ont été soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide après dénaturation par le mercaptoéthanol et le S.D.S. Les poids moléculaires ainsi trouvés correspondent de manière satisfaisante aux valeurs déterminées par l'analyse de la séquence des acides aminés, comme le montre le tableau I où son également reportés les poids moléculaires apparents déduits des figures 1 et 2. Il est à remarquer que les fortes déviations observées sur Ultrogel peuvent se deviner en beaucoup plus réduites dans les chromatographies sur Sephadex.

Pour obtenir quelques indications sur la nature du phénomène, les expériences ont été reprises en modifiant l'éluant ou les protéases. Les résultats portés dans le tableau II montrent que l'augmentation de la force ionique d'un facteur 4 ou l'adjonction d'un composé apolaire n'entraînent qu'une diminution modérée de l'anomalie, un peu plus sensible cependant dans le cas de l'incorporation du dioxanne. L'absence de modifications significatives sur Sephadex dans les mêmes conditions exclut la possibilité de changement notable de conformation. Par contre, comme le montre le tableau III, l'acétylation totale des protéases diminue fortement l'anomalie pour la subtilisine Carlsberg, la supprime totalement pour la trypsine ainsi que la subtilisine BPN' et même l'inverse pour l'α-chymotrypsine. La déacétylation des tyrosines ne restaure que légèrement la déviation pour la subtilisine Carlsberg et est pratiquement sans effet sur le comporte-

TABLEAU I.

Comparaison des poids moléculaires apparents des protéases en filtration sur gel et en électrophorèse.

Enzyme	P. M. (S. A. A.)	Electrophorèse S. D. S. P. M. app.	Sephadex G 75 P. M. app.	Ultrogel ACA 54 P. M. app.
Chymotrypsinogène	25 000	25 400		18 600
α-Chymotrypsine.....	25 000		25 300	19 400
Trypsine.....	24 000	23 800	23 100	10 300
Subtilisine BPN'.....	27 500	28 800	23 400	13 900
Subtilisine Carlsberg	27 300	29 200	21 500	7 200
Protéase T.....			23 200	28 600
Protéase C.....			20 100	19 200
Protéase CT			15 300	8 900

P.M.S.A.A. : Poids moléculaires (Daltons) déterminés d'après la séquence des acides aminés.

P.M. app. : Poids moléculaires apparents déduits des figures 1 et 2 en reportant sur la droite de régression le volume d'élution relatif (fig. 1 et 2) observé de la protéine.

ment des autres protéases. Les volumes d'élution obtenus sur Sephadex sont très légèrement réduits mais ne s'écartent pas significativement de la valeur théorique, ce qui confirme que les protéases ont conservé leur conformation globulaire.

TABLEAU II.

Effet de l'éluant sur l'écart relatif du volume d'élution des protéases à la valeur théorique.

	Ultrogel ACA 54			Sephadex G 75		
	Tris 50 mM KCl 100 mM	Tris 50 mM KCl 500 mM	Tris 50 mM KCl 100 mM Dioxanne 10 p. cent	Tris 50 mM KCl 100 mM	Tris 50 mM KCl 500 mM	Tris 50 mM KCl 100 mM Dioxanne 10 p. cent
α-Chymotrypsine	+ 7.7 p. cent	+ 8.2 p. cent	+ 2.2 p. cent	— 0.3 p. cent	— 0.5 p. cent	+ 0.3 p. cent
Trypsine	+ 24.4 p. cent	+ 17.2 p. cent	+ 16.3 p. cent	+ 1.1 p. cent	+ 1.3 p. cent	+ 5.2 p. cent
Subtilisine BPN'	+ 20.4 p. cent	+ 20.7 p. cent	+ 17.2 p. cent	+ 4.9 p. cent	+ 5.9 p. cent	+ 5.7 p. cent
Subtilisine Carlsberg	+ 39.6 p. cent	+ 33.8 p. cent	+ 22.9 p. cent	+ 7.4 p. cent	+ 6.9 p. cent	+ 3.3 p. cent

Les pourcentages indiqués correspondent au rapport $\frac{\text{Ve obs} - \text{Ve th}}{\text{Ve th}}$, différence entre le volume d'élution observé (Ve obs) et le volume d'élution théorique (Ve th) (correspondant sur la droite de régression au P.M. S.A.A.) sur ce volume théorique.

Pour chaque éluant les volumes d'élution des six marqueurs ont été mesurés et utilisés pour le calcul des volumes d'élution théoriques des protéases par régression linéaire.

TABLEAU III.

Effet de l'acétylation sur l'écart relatif du volume d'élution des protéases à la valeur théorique.

	Ultrogel ACA 54		Sephadex G 75	
	Acétylation totale	Acétylation partielle	Acétylation totale	Acétylation partielle
α-Chymotrypsine	— 8.3 p. cent	— 7.1 p. cent	— 2.5 p. cent	+ 4.0 p. cent
Trypsine	— 1.3 p. cent	— 0.1 p. cent	— 1.5 p. cent	+ 0.5 p. cent
Subtilisine BPN'	— 0.3 p. cent	+ 2.1 p. cent	— 1.1 p. cent	+ 2.8 p. cent
Subtilisine Carlsberg	+ 6.3 p. cent	+ 12.8 p. cent	— 0.5 p. cent	+ 1.1 p. cent

La signification des pourcentages est la même que dans le tableau II.

La colonne « acétylation totale » donne les résultats obtenus avec les protéases simplement acétylées, tandis que ceux des protéases traitées par l'hydroxylamine après acétylation sont portés dans la colonne « acétylation partielle ».

DISCUSSION.

Les résultats précédents montrent clairement qu'un facteur autre que le tamisage moléculaire intervient lorsque les protéases sont filtrées sur gel d'acrylamide-agarose. Les retards d'élution observés suggèrent qu'il s'établit entre ces enzymes et le gel des interactions réversibles qui retardent la migration. Un certain nombre de comportements anormaux sur Sephadex ont déjà été décrits concernant des glycoprotéines telles l'ovomucoïde [8] dont le volume d'élution est anormalement faible ou des enzymes glycolytiques tels le lysozyme [9] et l'amylase [10] dont l'élution est retardée, probablement par des interactions de type enzyme-substrat avec le gel, ce qui ne peut évidemment être invoqué dans le cas des protéases. Plus récemment cependant, le comportement anormal d'autres protéases sur Sephadex a été noté [11 et 12] sans qu'aucune explication ait été avancée. En effet, on ne peut expliquer la rétention par une simple interaction électrostatique entre les quelques charges négatives présentes dans le gel et la charge globale des protéines puisque selon cette hypothèse la subtilisine BPN' dont le point isoélectrique (Pi) est 7,8 ainsi que

l'α-chymotrypsine (Pi = 8,1) ne devraient pas être retardées alors que la trypsine (Pi = 10,8) devrait l'être plus que la subtilisine Carlsberg (Pi = 9,4) et le cytochrome C (Pi = 10) devrait l'être autant. Il faut cependant noter que la charge globale peut être responsable d'une partie de la rétention puisque celle-ci diminue par augmentation de la force ionique dans le cas de la trypsine et de la subtilisine Carlsberg.

Un autre processus fréquemment invoqué dans les phénomènes d'adsorption est l'interaction hydrophobe dont l'intervention a été démontrée dans l'association de la trypsine avec l'inhibiteur pancréatique [13] ou utilisé pour la purification de l'α-chymotrypsine sur Sepharose substitué avec des résidus 2,4-dinitrophényl [14]. A la concentration de 10 p. cent le dioxanne réduit significativement la rétention de toutes les protéases alors que le degré d'imbibition du gel n'est pas modifié et qu'aucun effet de partition notable n'est à craindre, comme l'ont montré Bush *et al.* [15] dans le cas du Sephadex. Il semble donc que des interactions hydrophobes interviennent, au moins pour partie, dans la rétention des protéases testées bien que dans le cas présent l'inactivation de la sérine du site actif ne modifie pas l'interaction.

On pourrait également penser à une action des acides aminés aromatiques puisque, outre leurs tendances hydrophobes, la richesse en électrons π de leur cycle a été reconnue responsable de leur adsorption sur Sephadex [16]. En fait, ce type d'interaction ne semble pas intervenir, sauf pour une faible part dans la subtilisine Carlsberg, car la déacétylation des tyrosines par l'hydroxylamine ne restaure pas l'anomalie.

Les charges positives des résidus lysine superficiels sont donc les responsables les plus vraisemblables de la rétention puique leur neutralisation par acétylation la fait disparaître. Ce résultat, assez surprenant étant donné ce qui a été dit plus haut, concorde pourtant avec ceux de Sharma *et al.* [6] qui ont montré que l'acétylation de l'α-chymotrypsine supprime également une interaction indispensable à sa fixation sur *D*-tryptophane methyl ester-Sepharose. Il faut donc supposer comme ces auteurs, qu'une répartition particulière des charges positives des groupes ε-aminés superficiels (donc sans rapport direct avec le Pi) permet des interactions électrostatiques avec les quelques groupements chargés du gel. Toutefois, il se pourrait aussi que l'adjonction des groupements acétyl à la surface de la protéase crée un empêchement stérique ou autre à l'interaction de résidus voisins.

Les anomalies qui viennent d'être décrites ne devraient cependant pas entraver la généralisation de l'emploi des gels mixtes d'acrylamide agarose qui se justifie par leur résolution très supérieure à celle du Sephadex. On peut même envisager l'utilisation systématique de l'Ultrogel pour séparer diverses enzymes protéolytiques d'un mélange comme cela a été fait avec succès pour les sucs digestifs de *Sabellaria alveolata*.

Remerciements.

Je remercie vivement le Professeur J. Pudles pour les précieux conseils qu'il m'a aimablement prodigués.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Reiland, J. (1971) in *Methods in Enzymology* (Jakobi, W. B. ed.), vol. XXII, pp. 287-321, Academic Press, New York and London.
2. Uriel, J., Bergès, J., Boschetti, E. & Tixier, R. (1971) *C. R. Acad. Sci. Paris*, Ser. D, **273**, 2358-2360.
3. Andrews, P. (1964) *Biochem. J.*, **91**, 222-233.
4. Hummel, B. C. W. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 137-142.
5. Weber, K., Pringle, P. R. & Osborn, M. (1972) in *Methods in Enzymology* (Hirs, C. H. W. & Timashell, S. ed.) vol. XXVI, pp. 3-27, Academic Press, New-York and London.
6. Sharma, S. K. & Hopkins, T. R. (1975) *J. Chromatog.*, **110**, 321-326.
7. Labouesse, J. & Gervais, M. (1967) *European J. Biochem.*, **2**, 215-223.
8. Peaucellier, G., manuscrit en préparation.
9. Whitaker, J. R. (1963) *Anal. Chem.*, **35**, 1950-1953.
10. Gelotte, B. (1964) *Acta Chem. Scand.*, **18**, 1283-1291.
11. Voordouv, G., Gaucher, G. M. & Roche, R. S. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 8-12.
12. Starkey, P. M. & Barret, A. J. (1976) *Biochem. J.*, **155**, 255-263.
13. Clothia, C. & Janin, J. (1975) *Nature*, **256**, 705-708.
14. Stepanov, V. M., Lavrenova, G. I., Borovikova, V. P. & Balandina, G. N. (1975) *J. Chromatog.*, **104**, 373-377.
15. Bush, B., Jones, T. E. L. & Thoburn Burns, D. (1970) *J. Chromatog.*, **49**, 448-454.
16. Janson, J. C. (1967) *J. Chromatog.*, **28**, 12-20.

Imprimerie Declume — Z.I. Lons-Perrigny.

ANNEXE 2

Develop., Growth and Differ., 23 (3), 287–296 (1981)

Development Growth & Differentiation

Acid Release at Activation and Fertilization of Starfish Oocytes

GERARD PEAUCELLIER AND MARCEL DOREE

Station Biologique, 29211, Roscoff, France

Fertilization or activation by ionophore A 23187 induces a transient acid release in prophase-blocked and in maturing oocytes of *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. 1-Methyladenine-induced maturation is not accompanied by acid release. There is no significant difference in the kinetic and amount of acid release related to the nature of activation or the stage of oocytes in each species. The amount of acid released per oocyte volume is smaller than total "fertilization acid" of sea urchin eggs but comparable to its Na-insensitive component. Cortical reaction can be initiated without significant acid release in ammonia treated oocytes. A burst of sodium influx occurs at activation or fertilization of oocytes. Kinetic and amount of Na influx are comparable to acid release. Vitelline membrane elevation is impaired upon activation of oocytes in the absence of extracellular sodium but a significant although smaller release of acid occurs. This suggests that starfish oocytes release acid by a mechanism differing from the Na^+–H^+ exchange of sea urchin eggs.

Acid is released from eggs of several species at fertilization. Early studies with sea urchin eggs led to various hypothesis (see 1for review), several of them involving the release of an acidic material from cortical granules during the cortical reaction. However, acid release is also observed in *Urechis* eggs which is not accompanied by cortical granule discharge (2). In *Spisula*, there is also an acid release without cortical reaction (3, 4) at fertilization. Recently, it has been shown in sea urchin eggs that acid release induces an increase in intracellular pH (see 5 for review). This implies that proton efflux is responsible of most of acid release.

In many species, including *Urechis* and *Spisula*, oocytes are released from prophase block by fertilization (6). This raises the possibility that change in intracellular pH might be significant not only for initiation of embryogenesis, but also for meiosis reinitiation. This hypothesis was recently substantiated by one of us (7) who demonstrated in *Sabellaria alveolata* that acid release occurs even when prophase-blocked oocytes are stimulated with specific homologous proteases (8, 7): in such case, meiosis is reinitiated, but oocytes stop again at metaphase 1.

In starfish, oocytes are released from prophase-block by a hormone originating from follicle cells (9) which has been identified as 1-Methyladenine (1-MeAde) (10). In natural conditions, fertilization occurs after germinal vesicle breakdown (11). In the laboratory however, it is also possible to fertilize prophase-blocked oocytes. In such case, cortical reaction occurs but meiosis is not reinitiated and polyspermy is the rule. Subsequent addition of 1-MeAde allows meiosis reinitiation (12, 13, 14). Cortical reaction can also be triggered by ionophore A 23187 in both prophase-blocked and matured oocytes (12). Thus starfish oocytes seem to provide a unique opportunity to dissociate activation by sperm or ionophore from maturation, by inversing the normal sequence of both development stages. The aim of this

paper was to compare the effects of both fertilization and activation on acid release from either prophase-blocked or maturing oocytes.

Materials and Methods

Immature follicle-free oocytes of *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis* were prepared as described previously (15) by washing and centrifuging them in artificial calcium-free sea water (Ca FSW). Oocytes were then washed and resuspended in natural sea water (NSW).

Mature oocytes were prepared either by addition of 1-MeAde (10^{-8} to 5×10^{-6} M, final concentration) to immature oocytes or by dissection of ovaries in NSW. In these species, 1-Me-Ade release from follicle cells is induced by contact with NSW. Once maturation is induced, follicle cells dissociate and are eliminated by three washes of NSW with a low speed centrifuge.

Sperm was prepared by tearing an isolated testis without sea water. Before use, 10 μl of semen were diluted in 420 μl of SW buffered at pH 8.2 with 5 mM Hepes-Na (N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) and containing 1 mM histidine to increase sperm motility (16).

Ionophore A 23187 was prepared as a 200 μM stock solution in methanol. Sodium-free artificial sea water (Na FSW) was prepared by substituting choline chloride (Merck) for NaCl and $KHCO_3$ for $NaHCO_3$ in artificial sea water prepared as previously described (8) and buffered at pH 8.2 with 5 mM Hepes-K. Ammonium chloride (Prolabo, RP) was prepared as a 1 M solution adjusted at pH 8.2 with NaOH.

Acid release was measured as described previously (7), in 5 or 6 ml of egg suspension (15,000 to 40,000 oocytes/ml) in NSW buffered at pH 8.2 with 5 mM Hepes-Na (unless otherwise indicated). Oocytes were kept in suspension by magnetic stirring with a suspended magnetic stirring bar to minimize egg crushing. pH was measured with a Metrohm EA 147 combined semi-micro electrode, a Metrohm E 512 pH-meter and a Sefram recorder, giving full scale deviation for a pH deviation of 0.25 pH unit.

Unless otherwise stated, back titration was performed by stepwise addition of 10 μl of 0.1 N NaOH or KOH. At the end of the experiment, oocyte concentration was scored in a Nageotte haemocytometer. All experiments were performed at room temperature (about 20°C).

To measure Na^+ uptake, 500 μCi carrier-free ^{24}Na were added to 10 ml of an oocyte suspension (usually: 20,000 oocytes/ml) which was maintained homogeneous by gentle stirring. 500 μl aliquots were taken as a function of time and injected into 4.5 ml ice-cold sea water before or after addition of either sperm (2 drops dry sperm diluted 1/10) or ionophore (stock solution: 200 μM in methanol; final concentration: 2 μM). After 10 sec. low speed centrifugation (about $1,000 \times g$), the pellet of oocytes was resuspended in cold sea water and immediately centrifuged again. Washing of the pellet was repeated 3 times. Finally 5 ml 0.5 N NaOH was added to the last pellet and the mixture left for 10 min at 85°C. Radioactivity was determined by Cerenkov counting.

Results

As shown in Figs. 1A, 1D and 1F, there was no burst of acid release when meiosis was reinitiated in prophase-blocked oocytes following 1-MeAde. The slight increase in the steady-state rate of acid release suggested by Fig. 1A was observed only in a few experiments.

When prophasic oocytes were activated by ionophore A 23187, there was a significant burst of acid release (Figs. 1B and 3B). After a sudden drop, which was an artefact due to dilution of ionophore (Fig. 1C) there was a lag of about 1 min, followed by the burst of acid release, and about 10 min later the rate of acid release reached another steady-state value. The amount of acid released during the burst was about 3.8 pico Eq. of acid per oocyte in *Asterias rubens* (Fig. 1B) and 3.4 pico Eq. per oocyte in *Marthasterias glacialis* (Fig. 3B). In these experiments, vitelline membrane elevated completely and cytological observation revealed no intact cortical granule 2 min. after ionophore addition. In some experiments however, vitelline

membrane elevated slowly and incompletely: in such cases, acid release was reduced with respect to experiments depicted on Figs. 1B and 3B. As already reported (12) activation did not reinitiate meiosis, but when 1-MeAde was added to activated oocytes, maturation occurred, without acid release (Fig. 1D).

When prophase-blocked oocytes were inseminated, a burst of acid release was also observed (Fig. 1E). The amount of acid released was of the same order of magnitude as following ionophore-induced activation (5.3 pico Eq./oocyte in *Asterias rubens*). The small initial drop was due to imperfect adjustment of the sperm suspension (Fig. 1F). The apparent lag phase may be questioned since agitation was stopped just after sperm addition to improve fertilization. The rather prolonged period of acid release (about 12 min) might be due to a poor synchronism in oocyte fertilization. In the experiment depicted on Fig. 1E, vitelline membrane elevated completely but oocytes showed several blisters, suggevsting that polyspermy occurred, as already described (13). Addition of 1-MeAde 70 min after fertilization reinitiated meosis, without acid release (Fig. 1F). Segmentation occurred in some eggs but in most cases cleavage was incomplete.

Fig. 2A and 3D depict respectively the time course of acid release after successfull activation by ionophore A 23187 of unfertilized eggs (following hormone induced maturation) in *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. In both cases the amount of acid released (*Asterias rubens*: 4.5 pico Eq./egg; *Marthasterias glacialis*: 3.5 pico Eq./egg) did not differ significantly from that recorded with prophase-blocked oocytes. Comparison of Figs. 2B and 1E makes clear that this holds true even when activation is brought about by fertilization rather than by ionophore treatment (respectively: 4.8 pico Eq. and 53. pico Eq. acid released from mature and prophase-blocked oocytes in *Asterias rubens*).

To investigate the influence of intracellular pH on acid release, 10 mM NH_4Cl ($pk_a = 9.25$) was added to sea water (pH: 8.2) containing *Marthasterias glacialis* oocytes. Due to cell membrane permeability to the undissociated but not to the dissociated weak base (17) and to the pH gradient between sea water and the inside of the oocyte, ammonia uptake increases intracellular pH. As shown in Fig. 3A important decrease of extracellular pH was observed, which was not due to acid release but to uptake of uncharged ammonia, as shown by WINKLER and GRAINGER (18) for sea urchin eggs. About 60 pico Eq. alkali were taken up per oocyte in *Marthasterias glacialis* during the rapid initial phase of ammonia equilbration between the inside and the outside of the oocyte. No significant difference was found between prophase-blocked and matured oocytes. On the other hand, acid release following activation with ionophore in the presence of ammonia (if significant) did not exceed respectively 0.5 and 0.6 pico Eq. per prophase-blocked or mature oocyte (Fig. 3C and 3E). In both cases, vitelline membrane elevation was normal.

Fig. 4 shows that a burst of Na^+ influx also occurs upon activation by ionophore of maturing oocytes in *Asterias rubens*. Similar results were obtained with prophase-blocked oocytes or when activation was brought about by fertilization. The burst of Na^+ uptake ranged from 1.7 to 4 pico Eq. Na^+/oocyte according to experiments. Both kinetics and amount of Na^+ uptake were therefore comparable to the corresponding results obtained for acid release, suggesting that acid release might be coupled to Na^+ uptake as demonstrated in sea urchin (19) and *Spisula* eggs (4).

In sodium-free sea water release is suppressed in *Spisula* and strongly reduced in sea urchin

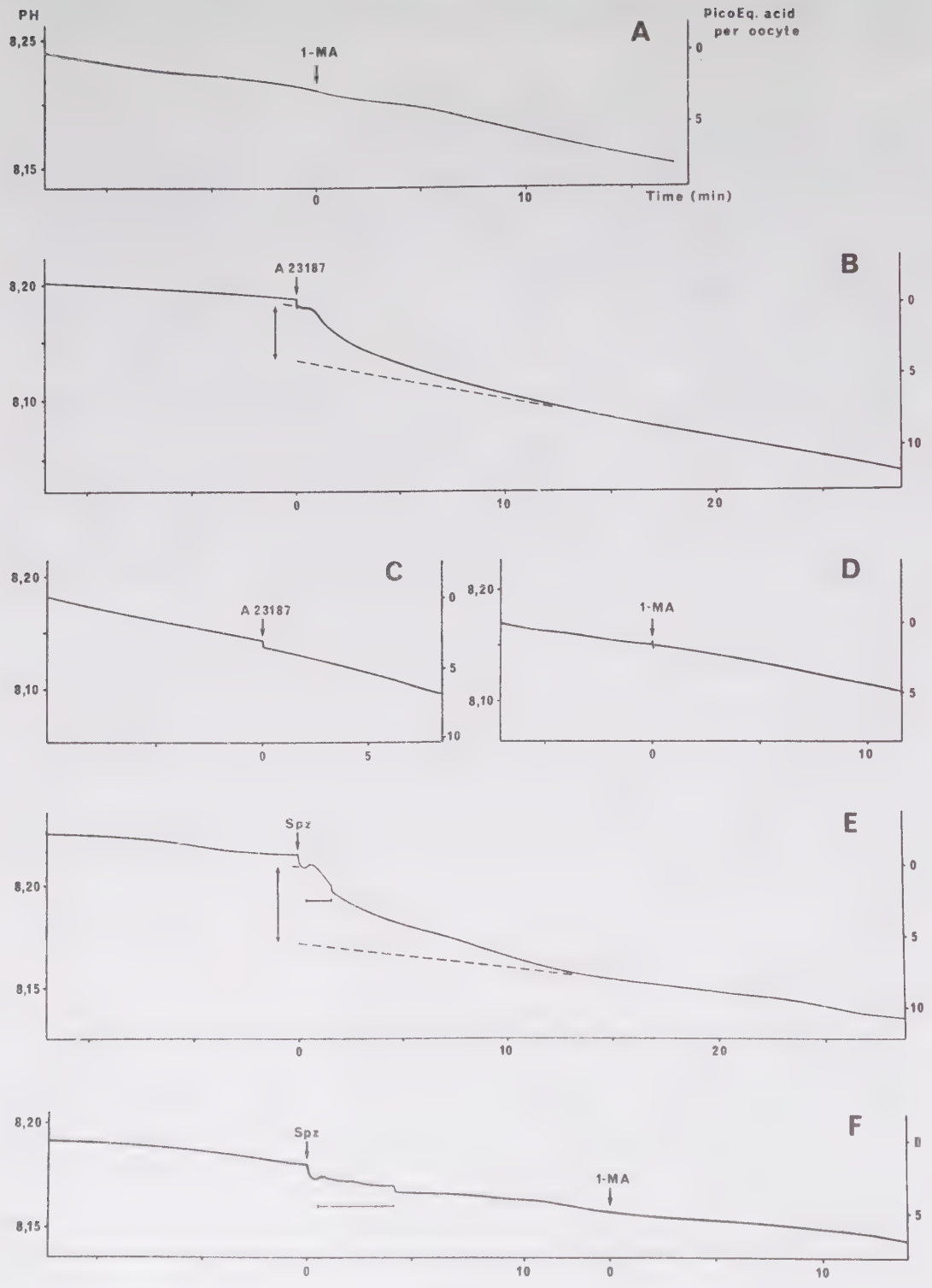

PH
8,25
8,15
A
1-MA
PicoEq. acid per oocyte
0
5
0
10
Time (min)
B
A 23187
8,20
8,10
0
5
10
0
10
20
C
A 23187
8,20
8,10
0
5
10
0
5
D
1-MA
8,20
8,10
0
5
0
10
E
Spz
8,20
8,15
0
5
10
0
10
20
F
Spz
1-MA
8,20
8,15
0
10
0
10
5

Fig. 1.

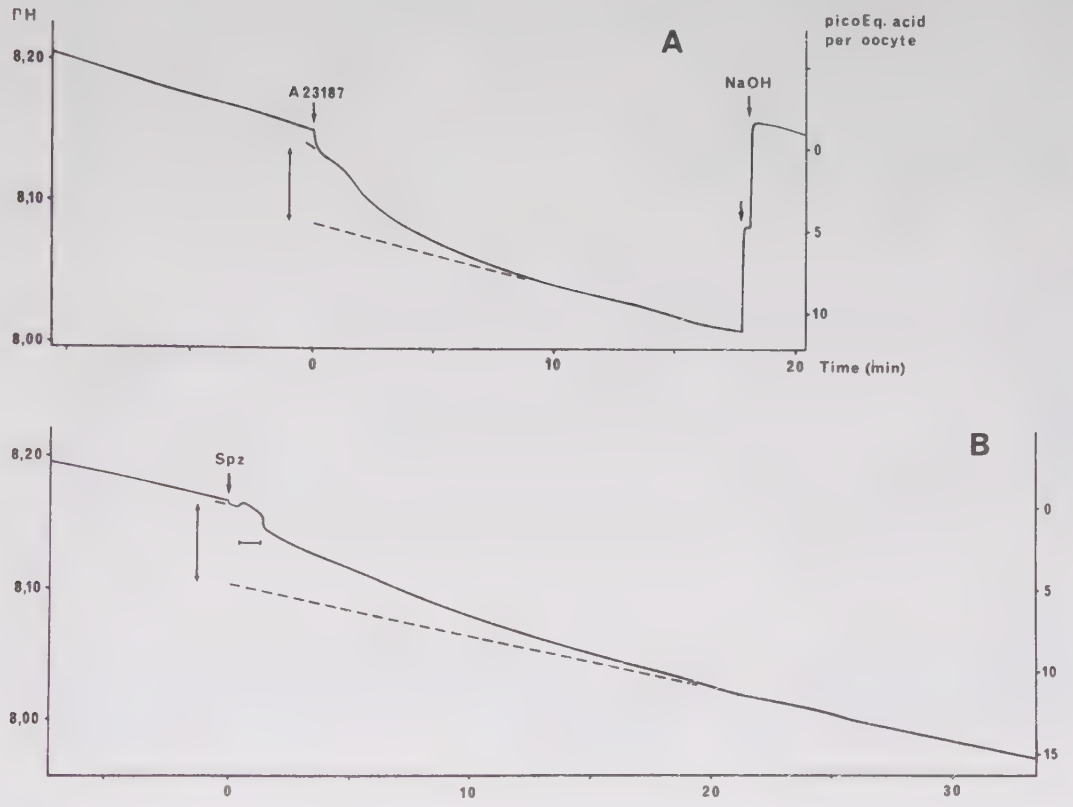


Fig. 2. Variations of extracellular pH following activation by ionophore A 23187 or sperm of maturing *Asterias rubens* oocytes. (A): 100 μl of a 2×10^{-4}M ionophore solution were added to 5 ml of an oocyte suspension (30,450 oocytes/ml) 45 min after induction of maturation by 1-MeAde. Back titration is shown on the right (each arrow corresponding to an addition of 10 μl 0.1 N NaOH). (B): 100 μl of diluted sperm were added to 6 ml of an oocyte suspension (30,000 oocytes/ml) about 1 hr after dilaceration of ovary in NSW.

Fig. 1. Variations of extracellular pH following either 1-MeAde induced meiosis reinitiation or activation by sperm or ionophore A 23187 of prophase-blocked *Asterias rubens* oocytes. (A): 100% maturation was initiated by addition of 25 μl of 1-MeAde 10^{-3} M (1-MA) to 5 ml of a suspension of prophase-blocked oocytes (29,400 oocytes/ml; 13% spontaneous maturation). (B): 100 μl ionophore 2×10^{-4} M (A 23187) were added to 6 ml of a suspension of oocytes (30, 100 oocytes/ml, 7% spontaneous maturation). All oocytes elevated vitelline membrane. Vertical bar on the left represents the burst of acid release. (C): Artefact due to ionophore dilution (continuation of B). After back titration (not shown) 100 μl of ionophore were added again, 40 min after the first addition. (D): Same batch of eggs as in B and C, after two washes in NSW. 50 μl of a 10^{-4} M 1-MeAde stock solution were added 2 hr after activation. Maturation was induced in 100% of the oocytes at the end of experiment. (E): 100 μl of a diluted spermatozoa suspension were added to 6 ml of a suspension of oocytes (16,400 oocytes/ml, 6% spontaneous maturation). Horizontal bar indicates the period when stirring was stopped to improve fertilization. 100% of the oocytes elevated vitelline membrane. (F): Continuation of E: artefact due to sperm addition and absence of acid release at maturation. After back-titration (not shown) a second addition of 100 μl of diluted sperm was done 1 hr after the first. 100% maturation was induced 73 min after fertilization by addition of 100 μl 1-MeAde 10^{-4} M. Scale on the right gives correspondence between pH scale and pico Eq. acid released per oocyte, as calculated from back titrations (not shown). All graphs (except in Fig. 3A) were corrected so that similar acid release per oocyte gave similar deviation in ordinate.

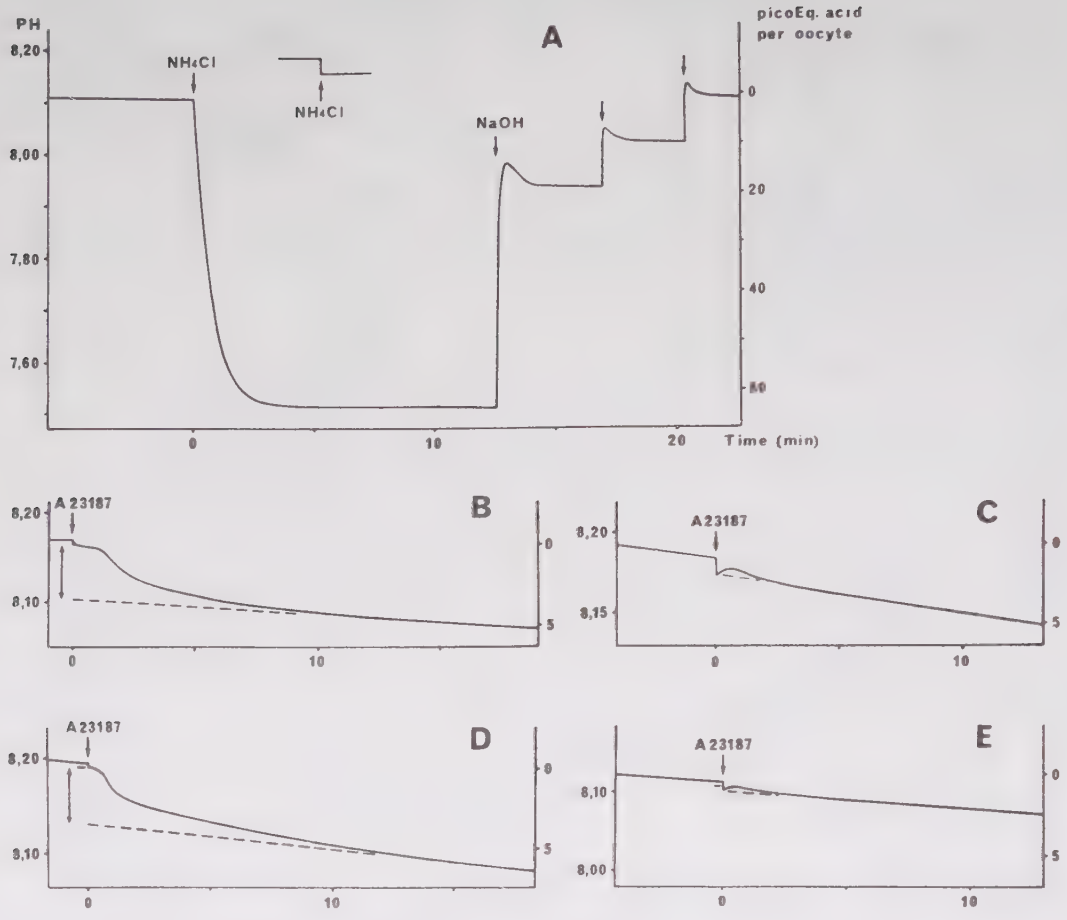


Fig. 3. Effect of NH_4 Cl on the variation of extracellular pH following activation by ionophore of *Marthasterias glacialis* oocytes. (A): 50 μl of a 1 M NH_4 Cl solution were added to 5 ml of a suspension of prophase-blocked oocytes (43,200 oocytes/ml, 13% spontaneous maturation). Back titration with 10 μl 1 N NaOH (first arrow) and two times 20 μl 0.1 N NaOH (second and third arrow) is shown on the right. In the upper part of the graph a control experiment is shown where 50 μl of a 1 M NH_4 Cl solution were added to 5 ml of NSW without oocytes. (B): 100 μl of a 2×10^{-4}M ionophore solution were added to 5 ml of suspension of prophase-blocked oocytes obtained from the same batch than in A, in absence of NH_4 Cl. 100% of oocytes elevated vitelline membrane. (C): Continuation of A: 100 μl of a 2×10^{-4}M ionophore solution were added 30 min after addition of NH_4 Cl. 100% of the oocytes elevated a vitelline membrane. (D): 100 μl of a 2×10^{-4}M ionophore solution were added to 6 ml of a suspension of maturing oocytes (45,000 oocytes/ml) 50 min after addition of 1 MeAde. 100% of the oocytes elevated vitelline membrane. (E): 100 μl of a 2×10^{-4}M ionophore solution were added to a 5 ml suspension of maturing oocytes (22,100 oocytes/ml) 70 min after dilaceration of ovary in NSW and 20 min after addition of NH_4 Cl (final concentration: 10 mM). Attention of the reader is called on the fact that buffering due to NH_4 Cl was corrected (right scale).

eggs. In starfish we found that when oocytes were activated with ionophore in Na FSW, vitelline membrane elevation was incomplete, but a significant burst of acid release (2.2 pico Eq./oocyte) still occurred (Fig. 5A). When 50 mM NaCl was added to oocytes activated in Na FSW some additional acid was released, 3.4 pico Eq/oocytes in the experiment depicted on fig. 5B, but more slowly that in similar experiments dealing with sea urchin and *Spisula*

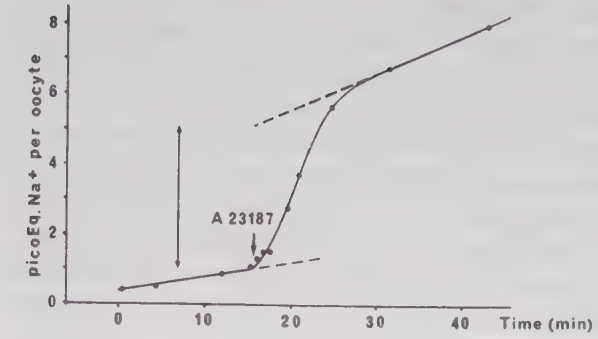


Fig. 4. ^{24}Na uptake in *Asterias rubens* oocytes following ionophore activation. ^{24}Na was added at zero time to a suspension of maturing oocytes (43,500 oocytes/ml) 45 min after dilaceration of the ovary in NSW. At the time indicated by arrow, ionophore was added at the final concentration 2 μM. Aliquots were collected as a function of time and processed for determination of ^{24}Na uptake as described in material and methods.

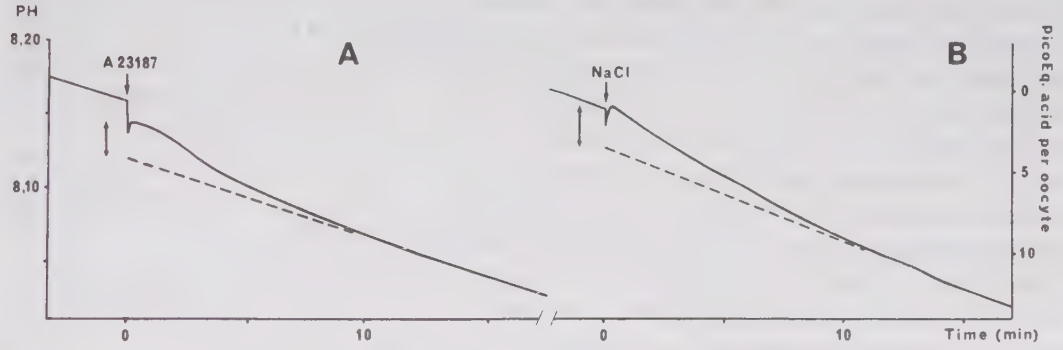


Fig. 5. Acid release induced by activation in Na FSW of maturing *Asterias rubens* oocytes. (A): 100 μl of a 2×10^{-4}M ionophore solution were added to 6.2 ml of oocyte suspension in Na FSW (55 min after dilaceration of ovary, in NSW and after 3 washes in Na FSW, 24,400 oocytes/ml). Vitelline membrane was visible in 100% of the oocytes but elevated only poorly. (B): Continuation of A: after back titration (not shown) 62 μl of a 5 M NaCl solution were added.

eggs. In another experiment (data not shown), *Asterias rubens* matured oocytes were activated in Na FSW containging 10^{-4}M amiloride, a drug which has been shown to inhibit Na^+–H^+ exchange in sea urchin eggs (20). 1.9 pico Eq. acid/oocyte were released but in this case also elevation of vitelline membrane was incomplete. Subsequent addition of 50 mM Na Cl also increased slowly acid release (0.9 pico Eq./oocyte/10 min).

Discussion

The present study shows that a significant burst of acid release occurs upon activation by sperm or ionophore of starfish oocytes, as already found for various species of marine invertebrates. The amount of acid released per egg differs widely according to species: from 1 pico Eq./egg in *Sabellaria alveolata* (7) to 6.1 pico Eq./egg in *Dendraster excentricus* (2). However, the radio of acid released per egg volume (in milliequivalents acid per liter of intracellular volume) shows lesser variations according to species since it is 5.2 for *Urechis*, 6.7 for *Strongylocentrotus*, 7.2 for *Dendraster* (2), 8 for *Psammechinus* (21), 9.8 for *Sphaerechinus* (Peaucellier, unpublished result), 7.0 to 9.7 for *Sabellaria* (7) and 6.8 for *Spisula* (4). Assuming an average diameter of 160 μ and 150 μ respectively for *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*

oocytes, liberation of 4.6 ± 0.6 picoEq/oocyte (mean and S.D. for 4 experiments) and 3.5 ± 0.3 picoEq./oocyte (5 experiments) would correspond to 2.1 m Eq.acid/l in the former and 2.0m Eq.acid/l in the latter starfish species. CUTHBERT *et al.* (21) have shown that acid release undergoes a two fold increase when extracellular pH is raised from 7.5 to 8.5. Since most works dealing with sea urchin and *Spisula* (but not *Urechis*) have been performed in unbuffered sea water at pH ranging from 8.0 to 7.5, whereas our experiments were done between pH 8.2 and 8.0, acid release might have been favoured in our conditions. The high value found in *Sphaerechinus* supports this view. So, the amounts of acid released per liter of intracellular volume following activation of starfish oocytes are significantly much lower than those found in sea urchin eggs. This cannot be due to the use of buffered sea water since we used Hepes ($pKa = 7.55$) which would not be expected to increase intracellular pH if, as most weak electrolytes (17, 18) it penetrates the cell in the undissociated form. This result is of special interest for cell physiology since it suggests that change in intracellular pH following activation must be small in starfish as compared to other species (if it is supposed that buffering power of intracellular medium does not differ greatly among species). pH of homogenates prepared from *Asterias rubens* oocytes according to JOHNSON *et al.* (20) (omitting trypsin pre-treatment) ranged from 6.2 to 6.4 according to batches of oocytes, but for a given batch activation by ionophore resulted in an increase of only 0.05 to 0.01 pH unit (data not shown). In control experiments with *Sphaerechinus granularis* we found that pH of homogenates changed by more than 0.3 units, as reported for other sea urchin species (20). As further control we added to an homogenate prepared from activated starfish oocytes an amount of acid corresponding to that released upon activation: again pH decreased by only 0.1 unit. We can conclude that acid release induced by activation or fertilization has only slight effect on intracellular pH in starfish.

We found that no significant release of acid occurred following 1-MeAde induced meiosis reinitiation. In addition, amounts of ammonia taken up during the initial phase of ammonia equilibration between the inside and the outside of the oocytes (60 pico Eq./oocyte) were found identical in oocytes treated or not with the hormone. This would suggest that the gradient of pH between the inside and the outside of the oocyte does not change during maturation. In our opinion, this does not contradict previous suggestion that H^+ might be exchanged against Ca^{2+} (22) as a consequence of 1-MeAde interaction with its membrane receptors (23, 15) since Ca^{2+} release is small and probably limited to the inner side of the plasma membrane (24, 22). Since it has been shown that "fertilization acid" is mainly due in sea urchin to an Na^+–H^+ exchange (5), and that 1-MeAde increase both active and passive permeability to Na^+ in starfish oocytes (25), the possibility existed that 1-MeAde-induced meiosis reinitiation might modulate the amount of "fertilization acid". We found however that both kinetics and amount of acid release were similar before or after completion of maturation induced by 1-MeAde.

We found that simultaneously with acid release occurred a burst of Na^+ uptake whose extent and duration were both similar to the corresponding features of acid release. In addition acid release was reduced from 4.6 to 2.2 picoequivalents/oocyte in *Asterias rubens* when Na^+ was suppressed from artificial sea water (no further reduction was found in the presence of amiloride), and 3.4 picoequivalents acid per oocyte were further released on addition of NaCl. These findings suggest that acid release is coupled, at least partially, to Na^+ uptake, in starfish oocytes as in sea urchin eggs. This conclusion might be however questioned for several reasons. First, the reduced amount of acid released in Na FSW might be due to impaired activation

since only poor vitelline membrane elevation occurred in Na FSW. Second, acid release following NaCl addition might be an artifact due to the increased tonicity of the medium. Finally, total acid release from starfish oocytes (2.0–2.1 mEq acid/l) is closer to the Na^+ — insensitive [1.9 mEq acid/l (19) and 1.3 mEq acid/l (20)] than to the Na^+ sensitive acid release [5.2 and 5.4 mEq acid/l] from sea urchin, which might indicate that starfish oocytes lack the Na^+ — dependent but not the Na^+ — independent process.

We considered the possibility that acid efflux might result from the release of some acidic material contained in cortical granules. Actually, acid release was always associated with cortical reaction (except in experiments with NH_4 Cl), as poor elevation of vitelline membrane with low level of acid release. We found however that ionophore induced cortical reaction without acid release in starfish oocytes treated with NH_4 Cl. The same methodology was used to rule out involvement of the cortical reaction in the mechanism of acid release from sea urchin eggs at fertilization (26). Recently, however, this conclusion was questioned by NISHIOKA *et al.* (27), who suggested that ammonia might penetrate cortical granules and neutralize their acidic content.

Since ionophore A23187 is known to mediate Ca^{2+}–H^+ exchange (28) and that Ca^{2+} and H^+ gradients would favour it, there is some possibility that acid release might at least partially result from Ca^{2+}–H^+ exchange. Unexpectedly, we found however that acid release was not reduced, but rather greatly increased, when activation was performed in Ca FSW (data not shown). Unfertilized eggs of *Asterias rubens released* 13 pico Eq. acid/egg and prophase blocked oocytes as much as 40 pico Eq./oocyte following ionophore-induced activation. In contrast, suppression of Ca^{2+} from ASW does not change acid release in sea urchin (19) or in *Urechis* (2) following egg activation. Since Ca^{2+} is required for stabilization or rapid repair of damages at the level of the plasma membrane (29, 30), one can ask whether acid release induced by either ionophore or fertilization might not represent, at least partially (and besides direct involvement of cortical granules content) a transient ion leakage due to the important transformation of the plasma membrane at the time of cortical reaction.

REFERENCES

1. GIUDICE, G., 1973. "Developmental Biology of the sea urchin Embryo", Academic Press, New-York.
2. PAUL, M., 1975. Develop. Biol., **43**, 299–312.
3. ALLEN, R. D., 1953. Biol. Bull., **105**, 213–239.
4. IL, I. and L. I. REBHUN, 1979. Develop. Biol., **72**, 195–200.
5. EPEL, D., 1978. In "Current Topics in Developmental Biology" (MOSCONA, A. A. and MONROY, A., ed.), vol. **12**, 185–246.
6. MASUI, Y. and H. J. CLARKE, 1979. Int. Rev. Cytol., **57**, 185–282.
7. PEAUCELLIER, G., 1978. Experientia, **34**, 789–790.
8. , 1977. Exptl. Cell Res., **106**, 1–14.
9. HIRAI, S., K. CHIDA and H. KANATANI, 1973. Develop. Growth and Differ., **15**, 21–31.
10. KANATANI, H., H. SHIRAI, K. NAKANISHI and T. KUROKAWA, 1969. Nature, **221**, 273–274.
11. ————, 1973. Int. Rev. Cytol., **35**, 253–298.
12. SCHUETZ, A. W., 1975. J. Cell Biol., **66**, 86–94.
13. CAYER, M. L., T. KISHIMOTO and H. KANATANI, 1975. Develop. Growth and Differ., **17**, 119–125.
14. LEE, H. H., E. GOLL and M. PLENZLER, 1975. Develop. Growth and Differ., **17**, 335–341.
15. DOREE, M. and P. GUERRIER, 1975. Exptl. Cell Res., **96**, 296–300.

16. FUJIMORI, T. and S. HIRAI, 1979. Biol. Bull., **157**, 249–257.
17. JACOBS, M. H., 1940. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **8**, 30–39.
18. WINKLER, M. M. and J. L. GRAINGER, 1978. Nature, **273**, 536–538.
19. PAUL, M. and D. EPEL, 1975. Exptl. Cell Res., **94**, 1–6.
20. JOHNSON, J. D., D. EPEL and M. PAUL, 1976. Nature, **262**, 661–664.
21. CUTHBERT, A. and A. W. CUTHBERT, 1978. Exptl. Cell Res., **114**, 409–415.
22. DOREE, M. and T. KISHIMOTO, 1980. In "Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins" (GUERN, J. and PEAUD-LENOEL, C., eds.), colloque international C. N. R. S., Springer Verlag, Berlin, in press.
23. KANATANI, H. and H. HIRAMOTO, 1970. Exptl. Cell Res., **61**, 280–284.
24. DOREE, M., M. MOREAU and P. GUERRIER. 1978. Exptl. Cell Res., **115**, 251–260.
25. DOREE, M., 1981. Exptl. Cell Res., **131**, 115–120.
26. PAUL, M., J. D. JOHNSON and D. EPEL, 1976. J. Expl. Zool., **197**, 127–133.
27. NISHIOKA, D. and N. MC GWIN, 1980. J. Exp. Zool., **212**, 215–223.
28. REED, P. W. and H. A. LARDY, 1972. In "The role of membranes in metabolic regulation"; (MEHLMAN, M. A. and HANSON, R. W., eds.), Academic Press, New-York, 111–131.
29. OHMORI, H. and M. YOSHII, 1977. J. Physiol., **267**, 429–463.
30. LOEWENSTEIN, W. R., 1966. Ann. New-York Acad. Sci., **137**, 441–472.

(Received for publication: April 8, 1981)

RESUME

Dans le règne animal, les ovocytes, après avoir achevé leur vitellogénèse, restent bloqués au stade diplotène de la prophase de première division méiotique jusqu'à la ponte. Chez les amphibiens et l'étoile de mer, la méiose est réinitiée par action directe d'une hormone sur les ovocytes. Les résultats obtenus sur ces espèces s'avèrent d'un grand intérêt pour la compréhension des processus de régulation de l'activité cellulaire. Il est toutefois nécessaire que des études similaires soient faites sur une assez grande variété d'espèces, appartenant aux divers groupes zoologiques, pour mieux dégager les processus essentiels. C'est dans cet esprit qu'a été entreprise l'étude de la réinitiation de la méiose chez l'annélide polychète *Sabellaria alveolata*.

Cette espèce est en effet un matériel assez favorable car elle fabrique des tubes de sable, agglomérés en récifs, accessibles à marée basse. Les sexes sont séparés et l'émission des gamètes est obtenue par simple extraction des animaux de leur tube. Malgré ces avantages, c'est une espèce peu utilisée en embryologie puisque l'étude la plus complète remonte à 1924 (Thèse de FAURE-FREMIET). On sait depuis cette époque que les ovocytes sont pondus en prophase de première division méiotique et passent immédiatement en métaphase où intervient un second blocage qui n'est levé que par la fécondation. C'est donc un système original par rapport à l'étoile de mer et aux batraciens.

L'étude ultrastructurale montre que la réinitiation de la méiose débute chez *Sabellaria* par une réaction corticale comparable à celle observée à la fécondation chez les échinodermes. Il semble que ce soit la seule exception connue à la règle générale selon laquelle la réaction corticale est responsable du blocage définitif de la polyspermie. La rupture de l'enveloppe nucléaire présente également l'originalité de ne pas être accompagnée de la disparition des pores nucléaires. D'autre part, la présence d'asters avec centrioles typiques dans le fuseau méiotique indique que c'est sant doute là une différence caractéristique entre la plupart des invertébrés et les vertébrés. Les chromosomes métaphasiques ont de plus la particularité d'être

enveloppés de réticulum endoplasmique, sans que ce soit apparemment en rapport avec le blocage en métaphase I.

Contrairement aux conclusions des auteurs précédents, les résultats obtenus montrent que la maturation n'est pas déclenchée par le simple contact des ovocytes avec l'eau de mer, mais est due à la contamination de l'eau de ponte par des protéases issues de la mère. Cette activité protéolytique peut, en effet, être mise en évidence dans la plupart des pontes à maturation "spontanée" et, si la ponte a lieu en présence d'inhibiteur de protéase, les ovocytes restent en prophase, même s'ils sont ensuite rincés avec de l'eau de mer normale. Comme le suc digestif des adultes contient de fortes concentrations d'endopeptidases, l'eau de ponte est facilement contaminée par défécation ou lésion du tube digestif lors de l'extraction du tube. De plus, les protéases de *Sabellaria* ont une activité spécifique pour la réinitiation de la méiose très supérieure à celle de toutes les autres protéases d'organismes divers qui ont été essayées.

C'est pour tenter d'élucider les raisons de cette spécificité que les protéases du suc digestif de *Sabellaria* ont été purifiées. Par filtration sur gel, chromatographie d'affinité et chromatographie échangeuse d'ions, on obtient finalement 11 protéases homogènes du point de vue électrophorétique, ce qui permet leur caractérisation. Leurs poids moléculaires sont très voisins (entre 26.000 et 35.000 daltons) alors que les points isoélectriques vont de 3 à 10. Toutes sont des endopeptidases à pH optimum basique et sont sensibles aux inhibiteurs spécifiques des protéases à sérine. Les caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques permettent de les séparer en 5 groupes : une protéase T, comparable à la trypsine; une protéase C_4 comparable à la chymotrypsine; les protéases C_2 et C_3, assez voisines de la chymotrypsine mais un peu moins spécifiques; un groupe de 6 protéases, dont les plus abondantes sont les protéases CT_1, CT_2, CT_3, hydrolysant à la fois les substrats de la trypsine et de la chymotrypsine; et une protéase CTδ également de spécificité mixte mais de plus faible activité estérolytique. Il semble que les protéases CT appartiennent à une catégorie encore non décrite de protéases à sérine car leur sensibilité aux inhibiteurs spécifiques les différencie des protéases bactériennes, auxquelles elles ressemblent par ailleurs. Il ne peut être exclu que certaine des protéases du suc digestif proviennent de la flore intestinale mais aucun argument ne supporte cette hypothèse.

Les caractéristiques enzymatiques des 5 groupes de protéases purifiées sont suffisamment différentes pour exclure qu'elles ne soient que des isoenzymes d'un type unique. Cependant, à l'exception de la protéase T, toutes les autres possèdent une activité spécifique élevée et comparable pour la réinitiation de la méiose. Ainsi, la concentration d'enzyme nécessaire pour déclencher la maturation de 50% des ovocytes est comprise entre 0,2 et 0,8 nanoM/l pour les protéases des groupes C et CT alors qu'elle est 100 fois plus élevée pour la protéase T. La plupart des endopeptidases d'origine animale, végétale ou microbienne essayées ne sont actives qu'à des concentrations encore plus fortes tandis que les autres types d'hydrolases sont inactives. Pourtant l'activité protéolytique des enzymes de *Sabellaria* sur les substrats tels que la caséine ou le "Hide powder azure" n'est pas supérieure à celle des autres enzymes. Aucune des caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques étudiées ne permet d'expliquer la spécificité des protéases C et CT de *Sabellaria*. Il est cependant démontré que c'est bien par protéolyse qu'est déclenchée la maturation des ovocytes. En effet, sous l'action de dérivés des chlorométhylcétones, qui inhibent l'activité enzymatique par alkylation d'un seul acide aminé du site actif, la capacité des protéases de *Sabellaria* à déclencher la maturation est diminuée dans les mêmes proportions que leur activité protéolytique. D'autre part, le temps de contact entre les ovocytes et les protéases, nécessaire pour réinitier la méiose, varie à l'inverse de la concentration d'enzyme.

Malgré leur spécificité, il n'est pas démontré que les protéases jouent un rôle dans les conditions naturelles. En effet, les ovocytes sont fécondables en prophase, même en présence d'inhibiteur de protéase, et donnent des larves nageuses normales. Le taux de fécondation est même meilleur en prophase qu'en métaphase I, pour une même concentration en spermatozoïdes. Bien que la présence de protéase dans l'acrosome des spermatozoïdes n'ait pu être démontrée, il se pourrait que les protéases digestives aient des caractéristiques similaires, ce qui expliquerait leur spécificité. Si par contre les protéases interviennent dans les conditions naturelles, c'est vraisemblablement pour limiter la polyspermie. En effet, il ne semble pas y avoir de processus efficace de blocage de la polyspermie dans les ovocytes en prophase.

Malgré ces incertitudes sur la reproduction dans les conditions naturelles, l'ovocyte de *Sabellaria* reste un bon matériel pour l'étude des processus impliqués dans la réinitiation de la méiose. Les résultats obtenus

confirment en premier lieu l'importance du calcium. En effet, sous l'action de l'ionophore A 23187, transporteur de calcium, la méiose est réinitiée mais il ne se produit pas de blocage en métaphase I et les ovocytes achèvent leur méiose. Par contre, ils ne se segmentent pas car lors de la recondensation des chromosomes, après la formation du pronucleus femelle, il ne se forme qu'un seul aster. Un influx de calcium n'est pas nécessaire puisque les ovocytes peuvent maturer dans de l'eau de mer sans calcium, aussi bien sous l'action de l'ionophore que des protéases. Ceci implique que des organites intracellulaires sont capables de libérer le calcium nécessaire. Parmi les autres ionophores essayés, ceux qui transportent sélectivement le potassium sont inactifs alors que ceux transportant divers ions monovalents déclenchent la maturation. De l'étude de diverses substances pharmacologiques, connues pour modifier la perméabilité membranaire, il ressort surtout que les doses sub-toxiques de la plupart d'entr'elles sont capables de déclencher le passage en métaphase I. Ces résultats conduisent à penser qu'un influx de sodium peut suffire à déclencher la maturation et effectivement on peut mettre en évidence une augmentation de la perméabilité au sodium grâce au ^{24}Na. On observe également une libération d'acide lors de la réinitiation de la méiose, quel que soit le stimulus utilisé (protéase, ionophore ou fécondation). Cette libération d'acide est comparable à celle qui se produit lors de la fécondation chez l'oursin. Ceci permet de supposer qu'une alcalinisation du pH intracellulaire joue un rôle dans la réinitiation de la méiose et n'est donc pas spécifique de la fécondation.

Les recherches récentes sur les amphibiens ont mises en évidence l'importance des modifications de phosphorylation des protéines pour l'apparition d'un facteur cytoplasmique responsable de la rupture de l'enveloppe nucléaire (MPF). Bien que des difficultés techniques ne permettent pas de prouver directement l'existence de MPF chez *Sabellaria*, on y observe d'importantes modifications des phosphorylations. Quel que soit le stimulus utilisé pour déclencher la méiose, l'incorporation de ^{32}P dans les protéines augmente rapidement jusqu'à la rupture de l'enveloppe nucléaire. L'autoradiographie de gels d'électrophorèse montre d'une part une augmentation de la radioactivité des phosphoprotéines déjà marquées dans les ovocytes en prophase et d'autre part un marquage nettement plus important au niveau de protéines pas, ou peu, marquées auparavant. Les expériences "*in vitro*" à

partir d'homogénats d'ovocytes révèlent également un niveau de phosphorylations endogènes plus élevé après maturation. Par contre, dans ces expériences "*in vitro*" il ne semble pas qu'il y ait intervention de protéine-kinases dépendantes du calcium ou de l'AMP-cyclique. Une autre particularité observée chez *Sabellaria* est la diminution importante de l'incorporation de ^{32}P lors de l'achèvement de la méiose. C'est là un argument supplémentaire en faveur d'une relation directe entre la réinitiation de la méiose et les phosphorylations.

D'autres aspects de la physiologie des ovocytes ont été sommairement étudiés pour comparaison avec les travaux faits sur d'autres espèces. Ainsi la consommation d'oxygène augmente notablement à la maturation chez *Sabellaria*, comme chez la plupart des autres espèces. De même, on retrouve chez *Sabellaria* une importante diminution de l'absorption des acides aminés et des précurseurs d'acides nucléiques à la maturation. Par contre, on n'y observe pas la stimulation de synthèse protéique fréquemment décrite, peut-être parce qu'elle est déjà très active dans les ovocytes bloqués en prophase. Par contre, le blocage en métaphase I est suivi de l'arrêt de la synthèse protéique.

L'ensemble de ces recherches fournit ainsi des données de base sur les divers aspects de la réinitiation de la méiose chez cet annélide. Outre l'intérêt comparatif, cette espèce présente des particularités qui pourront s'avérer utiles dans les recherches ultérieures. *Sabellaria* pourrait en particulier, être un matériel de choix pour l'étude de la mise en place et de la levée du blocage métaphasique.

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN, R.D., 1953 - Fertilization and artificial activation in the egg of the surf-clam, *Spisula solidissima*. *Biol. Bull.* 105, 213-239.

ALLEN, M.J., 1964 - Embryological development of a syllid, *Autolytus fasciatus*. *Biol. Bull.* 127, 187-205.

ALLEN, M.J., 1967 - Nucleic acid and protein synthesis in the developing oocytes of the budding form of the syllid, *Autolytus edwarsi* (class Polychaeta). *Biol. Bull.* 133, 287-302.

ARNON, R. 1970 - Papain. In "Methods in enzymology" (ed G.E. Perlmann & L. Lorand) vol. 19. Academic Press, New York 226-244.

ASHTON, F.T.. 1969 - Germinal vesicle breakdown in the eggs of *Spisula* and *Hydroides*. *Biol. Bull.* 117, 389.

ASNES, C.F. & SCHROEDER, T.E., 1979 - Cell cleavage. Ultrastructural evidence against equatorial stimulation by aster microtubules. *Exptl. Cell Res.* 122 (2) 327-338.

AUSTIN, C.R., 1978 - Patterns in metazoan fertilization. *Curr. Top. Dev. Biol.* 12, 1-9.

BELLE, R., BOYER, J. & OZON, R., 1979 - Endogenous phosphorylated proteins during maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Gamete Res.* 2, 137-145.

BLANKSTEIN, L.A. & KIEFER, B.I., 1977 - The relation of DNA and protein synthesis to the meiotic - mitotic transition in the zygote of *Urechis caupo*. *Develop. Biol.* 61, 1-10.

BOSMANN, H.B., 1977 - Cell surface enzymes : effects on mitotic activity and cell adhesion. *Int. Rev. Cytol.* 50, 1-23.

BRACHET, J. & DENIS-DONINI, S., 1977 - Effects de divers agents (ionophores du Ca^{++} et du K^{+}, organomercuriels, dithiols, colchicine, cytochalasine B) sur la maturation et la différenciation sans clivage chez l'oeuf de chaetoptère. *C. R. Acad. Sci. Paris D* 284, 1091-1096.

CAYER, M.L., KISHIMOTO, T. & KANATANI, H., 1975 - Formation of the fertilization membrane by insemination of immature starfish oocytes pretreated with calcium-free seawater. *Develop. Growth and Different.* 17, 119-125.

CHAMBERS, E.L., 1974 - Effects of ionophores on marine eggs and cation requirement for activation. *Biol. Bull.* 147 p. 471.

CHAMBERS, E.L., PRESSMAN, B.C. & ROSE, B., 1974 - The activation of sea urchin eggs by the divalent ionophores A23187 and X537 A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 126-132.

CHASE Jr T. & SHAW, E., 1970 - Titration of trypsin, Plasmin and Thrombin with p-nitrophenyl p^1-Guanidinobenzoate HCl. In "Methods in Enzymology" vol. 19 (G.E. Perlmann & L. Lorand ed.) p. 20-27, Academic Press, New York

CHAUVET, J. & ACHER, R., 1973 - Chromatographie d'affinité des Trypsines sur l'inhibiteur de Kunitz lié au Sepharose. *Biochimie*, 55 (10) 1323-1324.

CHOTHIA, C. & JANIN, J., 1975 - Principles of protein-protein recognition. *Nature*, 256, 705-708.

COLEMAN, P.L., LATHAM, Jr, H.G. & SHAW, E.N., 1976 - Some sensitive methods for the assay of trypsin-like enzymes. In "Methods in Enzymology" vol. 45 (ed. L. Lorand) p. 12-26. Academic Press, New York.

CRAGG, J.B., 1939 - The physiology of maturation and fertilization in Pomatoceros *triqueter* (L.). I - The nature of the material. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 23, 483-497.

CUATRECASAS, P., WILCHER, M. & ANFINSEN, C.B., 1968 - Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 61, 636-643.

CUNNINGHAM, L., 1965 - The structure and mechanism of action of proteolytic enzymes. In "Comprehensive biochemistry" vol. 16 (M. Florkin & E.H. Stotz, ed.). Elsevier, Amsterdam. p. 85-188.

CUTHBERT, A., & CUTHBERT, A.W., 1978 - Fertilization acid production in *Psammechinus* eggs under pH clamp conditions, and the effect of some pyrazine derivatives. *Exptl. Cell Res.*, 114, 409-415.

CUTTING, J.A. & ROTH, T.F., 1973 - Staining of phospho-proteins on acrylamide gel electrophoregrams. *Anal. biochem.* 54, 386-394.

DAS, N.K., 1976 - Cytochemical and biochemical analysis of development of *Urechis* oocytes. *Am. Zool.* 16 (3), 345-362.

DE FELICE, L.J. & DALE, B., 1979 - Voltage response to fertilization and polyspermy in sea urchin eggs and oocytes. *Develop. Biol.*, 72, 327-341.

DEHORNE, A., 1911 - Recherches sur la division de la cellule. II. homéotypie et hétérotypie chez les annélides polychètes et les Trématodes. *Arch. Zool. exp. gén.* 9, 1-175.

DEHORNE, A., 1913 - Nouvelles recherches sur les mitoses de maturation de *Sabellaria spinulosa*. *C.R. Acad. Sc. Paris* 156, p. 485.

DEMAILLE, J.G., PETER, K.A. & FISHER, E.M., 1977 - Isolation and properties of the rabbit skeletal muscle protein inhibitor of adenosine 3'-5'-monophosphate dependent protein kinases. *Biochemistry* 16, 3080-3086.

DE QUATREFAGES, A., 1848 - Mémoire sur l'embryogénie des Annélides. *Am. Sc. Nat. Zool.* 10, 153-201.

DESMEDT, J.E. & HAINAUT, D., 1976 - Régulation du calcium ionisé dans le cytosol de la cellule musculaire au repos : action du "Dantrolène" au niveau du reticulum sarcoplasmique. *C.R. Acad. Sci. Paris D* 283, 267-270.

DETTLAFF, T.A. & SKOBLINA, M.N., 1969 - The role of germinal vesicle in the process of oocyte maturation in *Anura* and *Ascipenseride*. *Ann. Embryol. Morphol.* suppl. 1, 133-151.

DETTLAFF, T.A., FEULGENGAUER, P.E. & CHULITZKAYA, E.V., 1977 - Effect of cycloheximide on desintegration of the germinal vesicle membrane and changes of the cortical layer in the oocytes of *Xenopus laevis* and *Acipensa stellatus* during their maturation under the influence of active cytoplasm. *Ontogenesis* 8, 478-486.

DEVILLEZ, E.J. & REED, R.M., 1971 - Comparative properties of polychaete trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* 38 B, 235-238.

DOREE, M., 1981 a - Stimulation hormonale précoce de la phosphorylation d'une protéine nucléaire de 38.000 dalton au cours de la réinitiation méiotique des ovocytes d'étoile de mer induite par la 1-méthyladénine. *C.R. Acad. Sci. III* 293, 519-522.

DOREE, M., 1981 b - Hormonal control of meiosis in starfish oocytes : calcium ion release induced by 1-methyladenine increases membrane permeability to sodium ions. *Exptl. Cell Res.* 131, 115-120.

DOREE, M., MOREAU, M. & GUERRIER, P., 1978 - Hormonal control of meiosis : *In vitro* induced release of calcium ions from the plasma membrane in starfish oocytes. *Exptl. Cell Res.* 115, 251-260.

DOREE, M., CAVADORE, J.C., LE PEUCH, C.J. & DEMAILLE J.G., 1981_a- Hormone induced phosphorylation of a 16.000 dalton polypeptide following méiosis reinitiation in starfish oocytes. *Exptl. Cell Res.* 135, 251-257.

DOREE, M. & KISHIMOTO, T., 1981_b- Calcium-mediated transduction of the hormonal message in 1-methyladenine-induced meiosis reinitiation of starfish oocytes. In "Metabolism and molecular activities of cytokinins" (Guern, J. & Peaud-Lenoel, C., ed.) colloque international CNRS Springer Verlag, Berlin.

DOREE, M., KISHIMOTO, T., LE PEUCH, C., DEMAILLE, J.G. & KANATANI, H., 1981_c- Calcium-mediated transduction of the hormonal message in meiosis reinitiation of starfish oocyte. *Exptl. Cell Res.* 135, 237-249.

ECKELBARGER, K.J., 1979 - Ultrastructural evidence for both autosynthetic and heterosynthetic yolk formation in the oocytes of an annelid (*Phragmatopoma lapidosa* : Polychaeta). *Tissue cell* 11 (3), 425-443.

ECKELBARGER, K.J. & CHIA, F.S., 1978 - Morphogenesis of larval cuticle in the polychaete *Phragmatopoma lapidosa* : A correlated scanning and transmission electron microscopic study from egg envelope formation to larval metamorphosis. *Cell Tiss. Res.* 186, 187-201.

EPEL, D., 1975 - The program of and mechanisms of fertilization in the echinoderm egg. *Amer. Zool.* 15 : 507-522.

EPEL, D., 1980 - Ionic triggers in the fertilization of sea urchin eggs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 339, 74-85.

ERLANGER, B.F. & EDEL, F., 1964 - The utilization of a specific chromogenic inactivator in an "All or none" assay for chymotrypsin. *Biochemistry* 3 (3), 346-349.

FAHRNEY, D.E. & GOLD, A.M., 1963 - Sulfonyl fluorides as Inhibitors of Esterases I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, α-chymotrypsin, and trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 997-1001.

FAURE-FREMIET, E., 1924 - L'oeuf de *Sabellaria alveolata*. *Arch. Anat. Micr.* 20, 211-342.

FOLK, J.E. & SCHIRMER, E.W., 1963 - The porcine carboxypeptidase A system. *J. Biol. Chem.* 238, 3884-3894.

FRANKLIN, L.E., 1966 - An egg cell-membrane derivative on the vitelline membrane of Annelid eggs. *Exp. Cell Res.* 43, 673-675.

FRITZ, H., WUNDERER, G. & DITTMANN, B., 1972 - Zur isolierung von Schweine und Human - Serumkallikrein durch Affinitätschromatographie (Spezifische bindung an wasserunlösliche - Kunitz - Sojabohnen - Inhibitor - Cellulosen und Dissoziation mit kompetitive Hemmstoffen (Benzamidin). *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 893-900.

FUJIMORI, T. & HIRAI, S., 1979 - Differences in starfish oocyte sysceptibility to polyspermy during the course of maturation. *Biol. Bull.* 157, 249-257.

GIBBS, P.E., 1971 - A comparative study of reproductive cycles in four polychaete species belonging to the family cirratulidae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 51, 745-769.

GIDHOLM, L., 1965 - On the morphology of the sexual stages, mating and egg laying in *Autolytus* (Polychaeta). *Zool. Bidr. Upps*, 37, 1-44.

GILLIES, R.J., ROSENBERG, M.P. & DEAMER, D.W., 1981 - Carbon dioxide efflux accompanies release of fertilization acid from sea urchin eggs. *J. Cell Physiol.* 108, 115-122.

GIUDICE, G., 1973 - Developmental biology of the sea urchin embryo *Academic Press, New York.*

GLABE, C. & LENNARZ, W.J., 1980 - The effect of chymostatin on sea urchin sperm and gamete interaction. *J. Cell Biol.* 87 (2), 142 a.

GOLD, A., 1965 - Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. III. Identification of serine as the site of sulfonylation in phenylmethane sulfonyl α-chymotrypsin. *Biochemistry* 4 (5), 897-901.

GOLDSTEIN, L., 1953 - A study of the mechanism of activation and nuclear breakdown in the chaetopterus egg. *Biol. Bull.* 105, 87-102.

GOMPERTS, B.D., 1977 - The plasma membrane : models for structure and function. *Academic Press, London.*

GOULD, M.C., 1969 - A comparison of RNA and protein synthesis in fertilized and unfertilized eggs of *Urechis caupo. Develop. Biol.* 19, 482-497.

GOULD-SOMERO, M. & HOLLAND, L., 1975 - Fine structural investigation of the insemination response in *Urechis caupo. Develop. Biol.* 46, 358-369.

GRAINGER, J.L., WINKLER, M.M., SHEN, S.S. & STEINHARDT, R.A., 1979 - Intracellular pH control protein synthesis rate in the sea urchin egg and early embryo. *Develop. Biol.* 68, 396-406.

GREENGARD, P., 1978 - Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science* 199 (4325) 146-151.

GRUET, Y., 1982 - Recherches sur l'écologie des "récifs" d'Hermelles édifiés par l'annélide *Sabellaria alveolata* (L.). Thèse Doctorat ès Sciences Université de Nantes.

GUERRIER, P. & FREYSSINET, G., 1974 - Protein synthesis during embryogenesis of *Sabellaria alveolata*.L((Polychaete annelid). *Exptl. Cell Res.* 87, 290-296.

GUERRIER, P., DOREE, M. & FREYSSINET, G.,-1975 - Stimulation précoce des activités protéines-kinases au cours du processus hormonal de réinitiation de la méiose dans les ovocytes d'étoiles de mer. *C.R. Acad. Sci.* 281 D, 1475-1478.

GUERRIER, P., MOREAU, M. & DOREE, M., 1977 - Hormonal control of meiosis in starfish : stimulation of protein phosphorylation induced by 1-methyladenine. *Mol. Cell Endocr.* 7, 137-150.

GUERRIER, P., MOREAU, M. & DOREE, M., 1978 - Control of meiosis reinitiation in starfish : calcium ion as the primary effective trigger. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 441-452.

GWYNN, I. ap & JONES, P.C.T., 1971 - On the egg nvestment and fertilization reaction in *Pomatoceros triqueter* L. an ultrastructural study. *Z. Zellforsch. Mikrok. Anat.* 113, 388-395.

HANOCQ, J., BALTUS, E. & STEINERT, G., 1974 - Effets de deux ionophores du calcium sur les oeufs de *Xenopus laevis*. *C.R. Acad. Sc. Paris*. 279, 2111-2114.

HANOCQ-QUERTIER, J. & BALTUS, E., 1981 - Phosphorylation of ribosomal proteins during maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Biochem.* 120, 351-355.

HARRIS, J.E., 1935 - Studies on living protoplasm : I. Streaming movements in the protoplasm of the egg of *Sabellaria alveolata*. *J. Exp. Biol.* 12, 65-79.

HARTLEY, B.S., 1960 - Proteolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 29, 45.

HEILBRUNN, L.V., DAUGHERTY, K.,& WILBUR, K.M., 1939 - Initiation of maturation in the frog egg. *Physiol. Zool.* 12 (2), 97-100.

HIGHMAN, K.C. & HILL, L., 1977 - The comparative endocrinology of the invertebrates. *Arnold London*.

HOSHI, M., MORIYA, T., AOYAGI, T., UMEZAWA, H., MOHRI, H. & NAGAI, Y., 1979 - Effects of hydrolase inhibitors on fertilization of sea urchins : 1 Protease inhibitors. *Gamete Res.* 2(2), 107-120.

HOUK, M.S., 1974 - Respiration of starfish oocytes during meiosis, fertilization, and artificial activation. *Exptl. Cell Res.* 83, 200-206.

HOWIE, D.I.D., 1961 - The spawning of *Arenicola marina* (L.). III. maturation and shedding of the ova. *J. Marine Biol. Assoc. U.K.* 41, 771-783.

HOWIE, D.I.D., 1963 - Experimental evidence for the humoral stimulation of ripening of the gametes and spawning in the polychaete *Arenicola marina* (L.). *Gen. Comp. Endocr.* 5, 40-44.

HOWIE, D.I.D., 1966 - Further data relating to the maturation hormone and its site of secretion in *Arenicola marina* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 6 (3),

HUCHON, D., OZON, R., FISCHER, E.H. & DEMAILLE, J.G., 1981 - La maturation méiotique de l'ovocyte de *Xenopus laevis* : mécanisme en quatre étapes. *C.R. Acad. Sci. D* 292, 65-67.

HYLANDER, B.L., ANSTROM, J. & SUMMERS, R.G., 1981 - Premature sperm incorporation into the primary oocyte of the polychaete *Pectinaria* : male pronuclear formation and oocyte maturation. *Develop. Biol.* 82 (2), 382-387.

II, I.,& REBHUN, L.I., 1979 - Acid release following activation of surf clam (*Spisula solidissima*) eggs. *Develop. Biol.* 72, 195-200.

IKEGAMI, S., OKADA, T.S. & KOIDE, S.S., 1975 - Factors involved in oocyte maturation in the polychaete *Chaetopterus pergamentaceus*. *Biol. Bull.* 149, 430-431.

IKEGAMI, S., OKADA, T.S. & KOIDE, S.S., 1976 - On the role of calcium ions in oocyte maturation in the polychaete *Chaetopterus pergamentaceus*. *Develop. Growth and Differ.* 18 (1), 33-43.

INAGAMI, T., 1964 - The mechanism of the specificity of trypsin catalysis. I. inhibition by alkyl ammonium ions. *J. Biol. Chem.* 239, 787-791.

INOUE, H. & YOSHIOKA, T., 1980 - Measurement of intracellular pH in sea urchin egg by ^{31}P NMR. *J. Cell Physiol.* 105, 461-468.

ITO, S. & WINCHESTER, R.J., 1963 - The fine structure of the gastric mucosa in the bat. *J. Cell Biol.* 16, 541

JACOBS, M.H., 1940 - Some aspects of cell permeability to weak electrolytes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. biol.* 8, 30-39.

JAMESON, G.W., ROBERD, D.V., ADAMS, R.W., KYLE, W.S.A. & ELMORE, D.T., 1973 - Determination of the operational molarity of solutions of Bovine α-chymotrypsin, trypsin, th and factor Xa by spectrofluorimetric titration. *Biochem. J.* 131, 107-117.

JAMESON, G.W. & ELMORE, D.T., 1974 - Affinity chromatography of bovine, trypsin. A rapid separation of bovine α and β trypsin. *Biochem. J.* 141, 555-565.

JOHNSON, J.D., EPEL, D. & PAUL, M., 1976 - Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature* 262, 661-664.

JOHNSON, C.H. & EPEL, D., 1981 - Intracellular pH of sea urchin eggs measured by the dimethyloxazolidinedione (DMO) method. *J. Cell Biol.* 89, 284-291.

JOHNSON, P.A. & JOHNSTONE, R.M., 1981 - Alterations in membrane permeability with trypsin treatment. *Can. J. Biochem.* 59 (8), 668-675?

JOHNSTON, R.N. & PAUL, M., 1977 - Calcium influx following fertilization of *Urechis caupo* eggs. *Develop. Biol.* 57, 364-374.

KANATANI, H., HIRAI, H., NAKANISHI, K. & KUROKAWA, T., 1969 - Isolation and identification of meiosis-inducing substance in starfish *Asterias amurensis*. *Nature* 221, 273-274.

KAPITANY, R.A. & ZEBROWSKI, E.J., 1973 - A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 56, 361-369.

KAPLAN, J.G. & BONA, C., 1974 - Proteases as mitogens. The effect of Trypsin and pronase on mouse and human lymphocytes. *Exptl. Cell Res.* 88, 388-394.

KISHIMOTO, T. & KANATANI, H., 1976 - Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocyte. *Nature* 260, 321-322.

KISHIMOTO, T. & KANATANI, H., 1977 - Lack of species specificity of starfish maturation-promoting factor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33 (1), 41-44.

KOCH, K.S. & LEFFERT, H.L., 1979 - Ionic landmarks along the mitogenic route. *Nature* 279, 104-105.

KOHLHARDT, M. BAUER, B., KRAUSE, H. & FLECKENSTEIN, A., 1972 - New selective inhibitors of the transmembrane Ca conductivity in mammalian myocardial fibres. Studies with the voltage clamp technique. *Experientia* 28 (3), 288-289.

KUO, J.F., ANDERSSON, R.G.G., WISE, B.C., MACKERLOVA, L., SALOMONSSON, I., BRACKETT, N.L., KATOH, N., SHOJI, M. & WRENN, R.W., 1980 - Calcium-dependent protein kinase : widespread occurence in various tissue and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (12), 7039-7043.

LAEMMLI, M.K., 1970 - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* vol 227, 680-685.

LASKOWSKI, M., 1955 - Trypsinogen and trypsin. In Methods in Enzymology (ed. S.P. Colowick & N.O. Kaplan) vol. 2. Academic Press, New York, p. 26-36.

LEACH, B.S., COLLAWN Jr,J.F. & FISH, W.W., 1980 - Behaviour of glycopolypeptides with empirical molecular weitht estimation methods. I. In sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 19 (25), 5734-5740.

LEVINE , A.E. & WALSH, K.A., 1980 - Purification of an acrosin-like enzyme from sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 255 (10), 4814-4820.

LOWE, D.A., RICHARDSON, B.P., TAYLOR, P. & DONATSCH, P., 1976 - Increasing intracellular sodium triggers calcium release from bound pools. *Nature* 260, 337-338.

LYMAN, J. & FLEMMING, R.H., 1940 - Composition of sea-water. *J. Mar. Res.*, 3, 134-146.

MALLER, J.L. & KREBS, E.G., 1977_a - Progesterone stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 252,(5), 1712-1718.

MALLER, J., WU, M. & GERHART, J.C., 1977_b - Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Biol.* 58, 295-312.

MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M., 1967 - Initiation aux techniques de l'histologie animale.

MASUI, Y., 1967 - Relative roles of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* 166, 365-376.

MASUI, Y. & MARKERT, C.L., 1971 - Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177, 129-146.

MASUI, Y. & CLARKE, H.J., 1979 - OOcyte maturation. *Int. Rev. Cytol.*

MATSUBARA, H., 1970 - Purification and assay of thermolysin. In "Methods in Embymology" (ed. G.E. Perlmann & L. Lorand) vol. 19. Academic Press, New York, 642-651.

MAZIA, D., 1974 - Chromosome cycles turned on in unfertilized sea urchin eggs exposed to NH_4OH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 71 n° 3, 690-693.

Mc RORIE, R.A. & WILLIAMS, W.L., 1974 - Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 777-803.

MEIJER, L., 1979 a - Hormonal control of oocyte maturation in *Arenicola marina* L. (annelida, polychaeta). I. Morphological study of oocytes maturation. *Develop. Growth differ.* 21 (4), 303-314.

MEIJER, L., 1979 b - Hormonal control of oocyte maturation in *Arenicola marina* L. (annelida, polychaeta). II. Maturation and fertilization. *Develop. Growth differ.* 21 (4), 315-329.

MERRIAM, R.W., 1961 - Nuclear envelope structure during cell division in *Chaetopterus* eggs. *Exptl. Cell Res.* 22, 93-107.

MICHEL, C., 1977 - Tissular localization of the digestive proteases in the sedentary polychaetous annelid *Sabellaria alveolata*. *Marine Biology* 44, 265-273.

MICHEL, C. & KEIL, B., 1975 - Biologically active proteins in the venomous glands of the polychaetous annelid *Glycera convoluta* Keferstein. *Comp. Biochem. Physiol.* 50 B, 29-33.

MICHEL, C. & DEVILLEZ, E.J., 1978 - Digestion. In "Physiology of annelids" (P.J. Mill ed.). Academic Press, New York, p. 509-554.

MICHEL, C. & DEVILLEZ, E.J., 1979 - Secretion of trypsin in the oesophagus of *Nereis virens* Sars (Polychaeta : errantia). A biochemical and histological study. *Biol. Bull.* 156, 224-233.

MIHALYI, E., 1972 - Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. *C.R.C. Press Cleveland.*

PASTEELS, J.J., 1935 - Recherches sur le déterminisme de l'entrée en maturation de l'oeuf chez divers invertébrés marins. *Arch. de Biol.* 46, 229-262.

PASTEELS, J., 1965 - Etude au microscope électronique de la réaction corticale. *J. Embryol. Exptl. Morph.* 13, 127

PAUL, M., 1975 - Release of acid and changes in light-scattering properties following fertilization of *Urechis caupo* eggs. *Develop. Biol.* 43, 289-312.

PAUL, M. & EPEL, D., 1975 - Formation of fertilization acid by sea urchin eggs does not require specific cations. *Exptl. Cell Res.* 94, 1-6.

PAUL, M., JOHNSON, J.D. & EPEL, D., 1976 - Fertilization acid of sea urchin eggs is not a consequence of cortical granule exocytosis. *J. Exp. Zool.* 197 (1) 127-133.

PEAUCELLIER, G. 1971 - Etude de la fécondation artificielle et essais de parthénogenèse expérimentale chez *Sabellaria alveolata* et *Sabellaria spinulosa*. DEA Zoologie expérimentale.Univ. Paris VII.

PEAUCELLIER, G., 1973 - Etude de la parthénogenèse artificielle chez *Sabellaria alveolata* (L.), Annélide Polychète. Thèse 3ème Cycle, Univ. Paris VI.

PEAUCELLIER, G., 1974 - Révision de la garniture chromosomique de *Sabellaria alveolata* (L.) et de *Sabellaria spinulosa* (Leuck.). *Cah. Biol. mar.*, 15, 465-469.

PEAUCELLIER, G., 1976 - Mise en évidence d'un comportement anormal de diverses enzymes protéolytiques en filtration sur gel de polyacrylamide-agarose. *Biochimie* 58, 1273-1276.

PEAUCELLIER, G., 1977 a - Initiation of meiotic maturation by specific proteases in oocytes of the polychete annelid *Sabellaria alveolata*. *Exptl. Cell Res.* 106, 1-14.

PEAUCELLIER, G., 1977 b - Mise en évidence du rôle du calcium dans la réinitiation de la méiose des ovocytes de *Sabellaria alveolata*. *C.R. Acad. Sci.* 285 D, 913-915.

PEAUCELLIER, G., 1978 a - Acid release at meiotic maturation of oocytes in the polychaete annelid *Sabellaria alveolata*. *Experientia* 34, 789-790.

PEAUCELLIER, G., 1978 b - Membrane acting drugs and meiosis reinitiation in *Sabellaria alveolata* (Polychaete annelid). *Biol. Cellulaire*, 32, 75-80.

PEAUCELLIER, G., GUERRIER, P. & BERGERARD, J., 1974 - Effects of cytochalasin B on meiosis and development of fertilized and activated eggs of *SAbellaria alveolata* (L.). *J. Embryol. Exp. Morph.* 31, 61-74.

MONROY, A., 1948 - A preliminary approach to the physiology of fertilization in *Pomatoceros triqueter* L. *Ark. Zool.* 40 A n° 21, P. 1-7.

MOORE, A.R., 1951 - Action of trypsin on the eggs of *Dendraster excentricus*. *Exp Cell Res.* 2, 284-287.

MOREAU, M., GUERRIER, P., DOREE, M. & ASHLEY, C.C., 1978 - Hormone-induced release of intracellular Ca^{2+} triggers meiosis in starfish oocytes. *Nature* 272, 251-253.

MORRIL, G.A. & MURPHY, J.B., 1972 - Role for protein phosphorylation in meiosis and in early cleavage phase of amphibian embryonic development. *Nature* 238, 282-284.

MURACHI, T., 1976 - Bromelain enzymes. In "Methods in Enzymology" vol. 45 (L. Lorand ed.) pp. 475-485. Academic Press, New York.

NARAHASHI, T., 1974 - Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.* 54 (a), 814-889.

NEURATH, H., WALSH, K.A. & WINTER, W.P., 1967 - Evolution of structure and function of proteases. *Science* 158, 1638-1644.

NISHIOKA, D. & Mc GWIN, N.F., 1980 - Relationships between the release of acid, the cortical reaction, and the increase of protein synthesis in sea urchin eggs. *J. Exp. Zool.* 212 (2), 215-223.

O'FARREL, P.H., 1975 - High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 (10), 4007-4021.

OHMORI, H. & YOSHII, M., 1977 - Surface potential reflected in both gating and permeation mechanism of sodium and calcium channels of the tunicate egg cell membrane. *J. Physiol.* 267, 429-463.

OKADA, K., 1941 - The gametogenesis, the breeding habits, and the early development of *Arenicola cristata* (Stimpon) a tubicolous polychaete. *Sci. Rep. Tohoka Imp. Univ. Ser.* 4, 16, 99-146.

OSTERHOUT, W.V.J., 1950 - Activation of *Nereis* eggs by a detergent. *Biol. Bull.* 99, 362

OTTESEN, M. & SVENDSEN, I., 1970 - The subtilisins. In "Methods in Enzymology" vol. 19 (G.E. Perlmann & L. Lorand, ed.). p. 199-215. Academic Press, New York.

PASSOW, H., 1971 - Effects of pronase on passive ion permeability of the human red blood cell. *J. Membrane Biol.* 6, 233-258.

PEAUCELLIER, G. & DOREE, M., 1981 - Acid release at activation and fertilization of starfish oocytes. *Dev. Growth Differ.* 23, 287-296.

PEAUCELLIER, G., DOREE, M. & DEMAILLE J.G., 1982 - Stimulation of endogenous protein phosphorylation in oocytes of *Sabellaria alveolata*((Polychaete annelid) at meiosis reinitiation induced by protease, fertilization or ionophore A23187. *Gamete Res.* 5, 115-123.

PENN, A. & GLEDHILL, B.L., 1972 a - Acrosomal proteolytic activity of amphibian sperm. A direct demonstration. *Exptl. Cell Res.* 74, 285-288.

PENN, A., GLEDHILL, B.L. & DARZYNKIEWICZ, Z., 1972 b - Modification of the gelatin substrate procedure for demonstration of acrosomal proteolytic activity. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 499-506.

PFEIFFER, D.R. & LARDY, H.A., 1976 - Ionophore A23187 : the effect of H^+ concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and the demonstration of K^+ transport in mitochondria mediated by A 23187. *Biochemistry* 15 (5), 935-943.

RACUSEN, D., 1967 - Double disc electrophoresis of proteins. *Nature* 213, 922

REED, P.W. & LARDY, H.A., 1972 a - A 23187 : A divalent cation innophore. *J. Biol. Chem.* 247, 6970-6977.

REISNER, A.H., NEMES, P. & BUCHOLTZ, C., 1975 - The use of Coomassie brilliant blue G 250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 64, 509-516.

REYNHOUT, J.K. & SMITH, L.D., 1974 - Studies on the appearance and nature of a maturation inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Develop. Biol.* 38, 394-400.

REYNOLDS, E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.

RIGHETTI, P.G. & CARAVAGGIO, T., 1976 - Isoelectric point and molecular weights of proteins. A table. *J. Chromatog.* 127, 1-28.

RIGHETTI, P.G., TUDOR, G. & EK, K., 1981 - Isoelectric points and molecular weights of proteins : a new table. *J. Chromatog.* 220, 115-194.

RINDERKNECHT, H., GEOKAS, M.C., SILVERMAN, P. & HAVERBACK, B.J., 1968 - A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta* 21, 197-203.

RINDERKNECHT, H. & FLEMING, R.M., 1975 - A new, highly sensitive and specific assay for chymotrypsin. *Clin. Chim. Acta* 59, 139-146.

RUSSO, S.F. & YADOFF, D.J., 1978 - Purification and characterization of trypsin like enzymes from the purple sea star *Pisaster ochraceus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 60 B, 453-457.

SCHEER, B.T. and SCHEER, M.A.R., 1947 - Some interrelationships of drugs and ion actions in the artificial activation of marine eggs. *Physiol. Zool.* 20, 15-32.

SCHLEUNING, W.D. & FRITZ, H., 1976 - Sperm Acrosin. In "Methods in Enzymology" vol. 45 (L. Lorand ed.) pp. 330-342. Academic Press, New York.

SCHLIEPER, P. & DE ROBERTIS, E., 1977 - Triton X-100 as a channel-forming substance in artificial lipid bilayer membranes, *Arch. Biochem. Biophys.* 184, 204-208.

SCHORDERET-SLATKINE, S. & SCHORDERET, M., 1976$_a$- Maturation *in vitro* de l'ovocyt de *Xenopus laevis* sous l'effet d'agents pharmacologiques du type propanolol. *C.R. Acad. Sci.* 282 (19 D) 1733-1736.

SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M. & BAULIEU, E.E., 1976$_b$- Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by lanthanum. *Nature*, 262 (5566), 289-290.

SCHROEDER, P.C. & HERMANS, C.O., 1975 - Annelida : polychaeta. In "Reproduction in marine invertebrates" (A.C. Giese & J.S. Pearse, eds.). vol. 3, pp. 1-213. Academic Press, New York.

SCHUETZ, A.W., 1967 - Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog *(Rana pipiens)* oocytes. *J. Exp. Zool.*, 166, 347-354.

SCHUETZ, A.W., 1969 - Oogenesis : processes and their regulation. *Adv. Resp. Physiol.* 4, 99-148.

SCHUETZ, A.W., 1975 - Cytoplasmic activation of starfish oocytes by sperm and divalent ionophore A23187. *J. Cell Biol.*, 66, 86-94.

SEKAR, V. & HAGEMAN, J.H., 1979 - Specificity of the serine protease inhibitor, phenylmethylsulforyl fluoride. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 89 (2), 474-478.

SHARMA, S.K. & HOPKINS, T.P., 1975 - Non specific binding in the affinity chromatography of chymotrypsin. *J. Chromatogr.* 110, 321-326.

SHAW, E. & RUSCICA, J., 1968 - The essentiality of Histidine in the catalytic action of Subtilisin. *J. Biol. Chem.* 243, 6312-6313.

SHAW, E. & GLOVER, G., 1970 - Further observations on substrate-derived chloromethyl ketones that inactivate trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 298-305.

SHAW, E. & RUSCICA, J., 1971 - The reactivity of His-57 in chymotrypsin to alkylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 484-489.

SHEN, S.S. & STEINHARDT, R.A., 1978 - Direct measurement of intracellular pH during metabolic derepression of the sea urchin egg. *Nature* 272, 253-254.

SHEN, S.S. & STEINHARDT, R.A., 1980 - Intracellular pH controls the development of new potassium conductance after fertilization of the sea urchin egg. *Exptl. Cell Res.* 125, 55-61.

SHOTTON, D.M., 1970 - Elastase. In "Methods in Enzymology" vol. 19. (GE Perlmann & L. Lorand). Academic Press, New York. pp. 113-140.

SICHEL, G., 1965 - Zona corticale e nucleo dell' ovocita in vitellogenesi di *Mercierella enigmatica* Fauvel studiati al microscopio ellecttronico (Annelida.Polychaeta). *Boll. Zool.* 32 (2), 283-288.

SILBERGELD, E.K., 1977 - Na^{+} regulator release of Ca^{++} sequestered in synapto somal mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 (2), 464-470.

SPURR, A.R., 1969 - A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-43.

STAMBAUGH, R., BRACKETT, B.G. & MASTROIANNI, L., 1969 - Inhibition of *in vitro* fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors. *Biol. reprod.* 1, 223

STEINHARDT, R.A., EPEL, D. & CAROLL Jun. E.J., 1974 b - Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs. *Nature* 252, 41-43.

STEPANOV, V.M., LAVRENOVA, G.I., BOROVIKOVA, V.P. & BALANDINA, G.N., 1975 - Chromatography of acid proteinases and chymotrypsin on a sorbent containing 2,4 - dinitrophenyl residues. *J. Chromatog.* 104, 373-377.

SUNKARA, P.S., WRIGHT, D.A. & RAO, P.N., 1979 - Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2799-2802.

SZOLLOSI, D., CALARCO, P. & DONAHUE, R.P., 1972 - Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 11, 521-541.

TAKAHASHI, K. & YOSHII, M., 1978 - Effect of internal free calcium upon the sodium and calcium channels in the turnicate egg analysed by the internal perfusion technique. *J. Physiol.* 279, 519-550.

TWEEDELL, K.S., 1966 - Oocyte development and incorporation of ^{3}H-thymidine and ^{3}H-uridine in *Pectinaria* (Cistenides) Gouldii. *Biol. Bull.* 131 (3), 516-538.

TWEEDELL, K.S., 1976 - Utilization of ^{3}H-thymidine triphosphate by developing stages of *Pectinaria gouldii*. *Biol. Bull.* 151, 260-271.

TYLER, A., 1941 - Artificial parthenogenesis. *Biol. Rev.* 16, 291-336.

UMEZAWA, H., 1972 - Enzyme inhibitors of microbial origin. University park Press, Tokyo.

URIEL, J., 1966 - Methode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. *Bull. Soc. Schim. Biol.* 48, 969-982.

VOGEL, R., FRAUTSCHOLD, I. & WERLE, E., 1968 - Natural proteinase inhibitors. Academic Press. New York. London.

WALSH, K.A., 1970 - Trypsinogens and trypsins of various species. In "Methods in Enzymology" (ed. G.E. Perlmann & L. Lorand). Vol. 19. Academic Press, New York. pp. 41-63.

WALSH, K.A. & WILCOX, P.E., 1970 - Serine proteases. In "Methods in Enzymology" (ed. G.E. Perlmann & L. Lorand). Vol. 19. Academic Press, New York. pp. 31-40.

WASSARMAN, P.M. & LETOURNEAU, G.E. , 1976 - RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature* 261, 73-74.

WASSERMAN, W.J. & MASUI, Y., 1975 - Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. *J. Exp. Zool.* 193, 369-376.

WEISS, G.B., 1974 - Cellular pharmacology of lanthanum. *A. Rev. Pharmac.* 14, 344-356.

WHITAKER, J.R., 1963 - Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on *Sephadex*. *Anal. Chem.* 35, 1950-1953.

WILCOX, P.E., 1970 - Chymotrypsinogens - chymotrypsins. In "Methods in Enzymology" (ed. G.E. Perlmann & L. Lorand). Vol. 19. Academic Press, New York. pp. 64-108.

WILKINSON, G.N., 1961 - Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.*, 80, 324-332.

WILSON, E.B., 1925 - "The cell in development and heredity". Mc Millan, New York.

WILSON, D.P., 1968 - Some aspects of the development of eggs and larvae of *Sabellaria alveolata*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 48, 367-386.

WINKLER, M.M. & GRAINLER, J.L., 1978 - Mechanism of action of NH_4Cl and other weak bases in the activation of sea urchin eggs. *Nature* 273, 536-538.

WINKLER, M.M. & STEINHARDT, R.A., 1981 - Activation of protein synthesis in a sea urchin cell free calcium. *Develop. Biol.* 84, 432-439.

WINKLER, M.M., MATSON, G.B., HERSHEY, J.W.B. & BRADBURY, E.M., 1982 - ^{31}P-NMR study of the activation of the sea urchin egg. *Exptl. Cell Res.* 139, 217-222.

WOLFF, E.C., SCHIRMER, E.W. & FOLK, J.E., 1962 - The kinetics of carboxypeptidase B activity. *J. Biol. Chem.* 237, 3094-3099.

ZAMPETTI-BOSSELER, F., HUEZ, G. & BRACHET, J., 1973 - Effects of several inhibitors of macromolecule synthesis upon maturation of marine invertebrate oocytes. *Exptl. Cell Res.* 78, 383-393.

ZOTTOLI, R.A. & CARRIKER, M.R., 1974 - External release of protease by stationary burrow-dwelling polychaetes. *J. Mar. Res.* 32, 331-342.